

# RETENTATE CHROMATOGRAPHY AND PROTEIN CHIP ARRAYS WITH APPLICATIONS IN BIOLOGY AND MEDICINE

Publication number: JP3287578 (B2)

Publication date: 2002-06-04

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- international:

A61K49/00; B01J20/286; B01J20/32; C12M1/34; C12M1/42; C12N15/09; C12Q1/00; C12Q1/68; C40B30/04; G01N27/62; G01N27/64; G01N30/00; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/53; G01N33/531; G01N33/536; G01N33/543; G01N33/566; G01N33/68; G01N37/00; H01J49/04; H01J49/26; B01D15/38; C40B40/10; G01N30/02; G01N30/46; G01N30/90; G01N30/95; A61K49/00; B01J20/281; B01J20/30; C12M1/34; C12M1/42; C12N15/09; C12Q1/00; C12Q1/68; C40B30/04; G01N27/62; G01N27/64; G01N30/00; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/53; G01N33/531; G01N33/536; G01N33/543; G01N33/566; G01N33/68; G01N37/00; H01J49/02; H01J49/26; B01D15/28; C40B40/04; (IPC1-7): C12Q1/68; G01N27/62; G01N27/64; G01N30/00; G01N33/53; G01N33/566; G01N37/00

- European:

B01J20/286; B01J20/32; C12Q1/00; C40B30/04; G01N30/48A; G01N33/531; G01N33/538; G01N33/543; G01N33/543F; G01N33/566; G01N33/68A; G01N33/68A10

Application number: JP19990504918T 19990619

Priority number(s): WO1998US12908 19980619; US1997005433P 19970620; US19970067484P 19971201

Also published as:

JP20000516727 (T)  
WO9856362 (A1)  
WO9856361 (A1)  
WO9856380 (A1)  
NZ530907 (A)

more >>

Abstract not available for JP 3287578 (B2)

Abstract of corresponding document: WO 9856362 (A1)

This invention provides methods of retentate chromatography for resolving analytes in a sample. The methods involve adsorbing the analytes to a substrate under a plurality of different selectivity conditions, and detecting the analytes retained on the substrate by desorption spectrometry. The methods are useful in biology and medicine, including clinical diagnostics and drug discovery.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

**Also published  
as:**

WO9859361 (A1)  
WO9859360 (A1)  
WO9859360 (A1)  
EP0990258 (A1)  
EP0990257 (A1)

[more >>](#)

**Classification:**

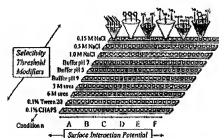
- european: B01J20/289; B01J20/32; C12Q1/00; G01N30/48A1; G01N33/531; G01N33/538; G01N33/543; G01N33/543F; G01N33/566; G01N33/58A; G01N33/58A10

**Priority number(s):** US19970054333P 19970620; US19970067484P 19971201

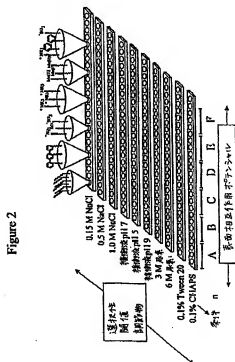
US5453199  
US5498545  
WO8903430  
US4752562  
GB2281122

[Report a data error here](#)

This invention provides methods of reiterate chromatography for resolving analytes in a sample. The methods involve adsorbing the analytes to a substrate under a plurality of different selectivity conditions, and detecting the analytes retained on the substrate by desorption spectrometry. The methods are useful in biology and medicine, including clinical diagnostics and drug discovery.



Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide



## 【特許請求の範囲】

1. 試料中の少なくとも1つの被分析物を検出するための基材を調製する方法であって、

a) 少なくとも2つの異なる選択条件に該試料を曝露する工程であって、各選択条件は、該吸着体による該被分析物の保持を可能にするために、該吸着体と溶離物との組み合わせによって規定される、工程；

b) 該被分析物を保持される少なくとも1つの選択条件下で、脱離スペクトロメトリーによって同定する工程；および

c) 同定された選択条件の少なくとも1つの吸着体を含む基材を調製する工程を包含する、方法。

2. 前記同定する工程が、複数の被分析物を保持される少なくとも1つの選択条件下で同定する工程を包含する、請求項1に記載の方法。

3. 前記調製する工程が、複合吸着体として溶離条件下で前記被分析物を保持する複数の吸着体を含む基材を調製する工程を包含する、請求項1に記載の方法。

4. 試料中の被分析物についての改良された分離を有する選択条件を進行的に同定する方法であって、

(a) 以下の工程によって、試料中の被分析物を保持する選択条件を同定する工程：

(i) 選択条件のセットに試料を曝露する工程であって、各選択条件が、少なくとも1つの結合特性および少なくとも1つの溶離特性によって定義される、工程；

(ii) 脱離スペクトロメトリーによって各選択条件下で保持される被分析物を検出する工程；および

(iii) 山該被分析物を保持する選択条件を同定する工程；ならびに

(b) 以下の工程によって、該被分析物についての改良された分離を有する選択

条件を同定する工程：

(i) 該同定された選択条件から少なくとも1つの結合特性または溶離特性を選択する工程、および選択特性定常セットにそれを添加する工程；

(ii)選択条件の改変されたセットに該試料を曝露する工程であって、該異変されたセットにおける各選択条件が、(1)該定常セットにおける該選択特性、および(2)該定常セットにはない結合特性または溶離特性を含む、工程；および

(iii)先の同定された選択条件と比較して改良された分離で該被分析物を保持する脱離スペクトロメトリーによって、改変されたセットから選択条件を同定する工程、  
を包含する、方法。

5. 工程(b)を少なくとも1回反復する工程をさらに包含する、請求項4に記載の方法。

6. 選択条件が、前記試料から前記標的被分析物のみを保持することが同定されるまで、工程(b)を反復する工程を包含する、請求項5に記載の方法。

7. 請求項4に記載の方法によって被分析物を分離するために同定された選択条件からの吸着体を含む、脱離スペクトロメトリーののための基材。

8. 前記吸着体と組み合わせて前記溶離物を使用することにおいて、前記選択条件からの溶離物または指示をさらに含むキットの形態での、請求項7に記載の基材。

9. 被分析物が、第1および第2の生物学的試料に示差的に存在するかどうかを決定する方法であって、

a)少なくとも1つの選択条件についての該第1の試料中の該被分析物について、第1の保持マップを決定する工程；

b)同じ選択条件についての該第2の試料中の該被分析物について、第2の保持マップを決定する工程；および

c)該第1と該第2の保持マップとの間の差を検出する工程；  
を包含し、

これによって、該保持マップにおける差は、該被分析物が第1および第2の試料に示差的に存在する決定を提供する、方法。

10. 請求項9に記載の方法であって、前記第1の生物学的試料が、健康被験体に由来し、そして前記第2の生物学的試料が、病理学的状態に罹患している被験

体に由来する、方法。

11. 前記生物学的試料は、第1および第2の細胞抽出物を含む、請求項9に記載の方法。

12. 前記保持マップが、複数の選択条件を含む、請求項9に記載の方法。

13. 検出工程の前に、前記被分析物を、前記被分析物の分子量よりも小さい分子量の少なくとも1つのフラグメントに変換する工程を包含する、請求項9に記載の方法。

14. 差を検出する工程が、プログラム可能なデジタルコンピュータで行われる、請求項9に記載の方法。

15. 物質が生物学的試料中でタンパク質の発現を変更するかどうかを決定するための、請求項9に記載の方法であって、第2の生物学的試料にではなく第1の生物学的試料に物質を投与する工程をさらに包含する、方法。

16. 前記試料が、血液、尿、血清、および組織からなる群より選択される、請求項10に記載の方法。

17. 請求項10に記載の方法であって、前記第1の生物学的試料よりも第2の生物学的試料において多くの量が存在する被分析物を同定する工程をさらに包含し、これによって、該被分析物が、前記病理学的状態についての候補診断マーカーとして同定される、方法。

18. 前記第1の細胞抽出物が、健常細胞に由来し、そして前記第2の細胞抽出物が、ガン細胞に由来する、請求項11に記載の方法。

19. 被験体において少なくとも1つの診断マーカーによって特徴づけられる病気を診断する方法であって、

a) 少なくとも1つのアドレス可能位置を含む脱離スペクトロメトリーでの使用のための基材を提供する工程であって、各アドレス可能位置は、溶離条件下で少なくとも1つの該診断マーカーを分離する吸着体を含む、工程；

b) 該診断マーカーの保持を可能にするための溶離条件下で、該被験体からの生物学的試料に該基材を曝露する工程；および

c) 脱離スペクトロメトリーによって、保持された診断マーカーを検出する工程

;

を包含し、

これによって、保持された診断マーカーを検出する工程が、該病気の診断を提供する、方法。

20. 請求項19に記載の方法であって、診断が、複数の診断マーカーの検出を含み、そして前記アドレス可能位置が、該複数の診断マーカーを分離する吸着体を含む、方法。

21. 試料中の被分析物を検出するためのキットであって、(1)少なくとも1つのアドレス可能位置を含む脱離スペクトロメトリーでの使用のための基材であって、各アドレス可能位置が、該吸着体および溶離物を含む選択条件下で被分析物を分離する吸着体を含む、基材、および(2)該選択条件に該試料を曝露するため

の該溶離物または指示、を含む、キット。

22. 病気の診断のための請求項21に記載のキットであって、前記少なくとも1つの該被分析物が、該病気についての少なくとも1つの診断マーカーである、キット。

23. 請求項22に記載のキットであって、前記病気が、複数の診断マーカーによって特徴づけられ、そして前記基材が、複数のアドレス可能位置を含み、各アドレス可能位置が、少なくとも1つの該診断マーカーを分離する吸着体を含む、キット。

24. 少なくとも1つの吸着体が、少なくとも1つの診断マーカーをそれぞれ保持する吸着体種を含む複合吸着体である、請求項23に記載のキット。

25. 少なくとも1つの吸着体が、バイオポリマーを含まない、請求項23に記載のキット。

26. 少なくとも1つのアドレス可能位置が、診断マーカーに特異的なリガンドを含む、請求項23に記載のキット。

27. 前記リガンドが抗体である、請求項26に記載のキット。

28. 少なくとも1つのアドレス可能位置に少なくとも1つの吸着体を含む、脱離スペクトロメトリーのための基材であって、該少なくとも1つの吸着体が、患

者試料からの病理学的状態についての複数の診断マーカーを分離する、基材。

29. 少なくとも1つの吸着体が、バイオポリマーを含まない、請求項28に記載の基材。

30. 1つの吸着体が、複数の診断マーカーを分離する、請求項28に記載の基材。



## 【発明の詳細な説明】

生物学および医学に応用される被保持物クロマトグラフィーおよび

タンパク質チップアレイ

関連出願の交互参照

本出願は1997年6月20日出願の同時係属出願60/054,333および1997年12月1日出願の同時継続出願60/067,484の優先日に基づく優先権を主張する。これらの出願の内容はその全体が本明細書中に参考として援用される。

合衆国が後援する研究または開発

適用なし

## 発明の背景

本発明は分別科学 (separation science) および分析生化学の分野に関する。

本発明の方法は、生物学および医学(遺伝子機能の分析、示差的な遺伝子発現、タンパク質の発見、細胞のおよび臨床的診断および薬物スクリーニングを包含する)に適用される。

細胞機能は、正常機能および病理学的機能の両者とも、一部には、細胞によって発現される遺伝子(すなわち遺伝子機能)に依存する。遺伝子発現は定性的および定量的な両方の局面を有する。すなわち、細胞は、発現される特定の遺伝子に関して、同じ遺伝子の発現の相対レベルに関しての両方で異なり得る。示差的な遺伝子発現は、例えば、その遺伝子によってコードされるタンパク質の発現における差異、または発現されるタンパク質の翻訳後調節における差異によって明白になり得る。例えば、タンパク質は、炭水化物またはリン酸基で修飾され得、あるいはペプチド切断を通じてプロセッシングされ得る。従って、生化学レベルにおいて、細胞は生物体生体分子の複合体混合物を表す。

機能的遺伝子混合物 (genomics) (「タンパク質混合物 (proteomics)」)の1つの目標は細胞型の間で示差的に発現される生物体生体分子の同定および特徴付けである。発現を比較することによって、細胞の特定の病理学的作用の原因となり得る分子を同定することができる。例えば、癌細胞中で発現するが正常細胞中

では発現しないタンパク質を同定することは、診断のために有用であり、そして

最終的には薬物の発見および病理学的処置のために有用である。ヒトゲノムプロジェクトが完了すれば、全てのヒト遺伝子はクローン化され、配列決定され、そしてデータベースとして体系化される。この「ゲノム後 (post-genome)」の世界では、示差的に発現されたタンパク質を同定する能力は、今度は、それをコードする遺伝子の同定に通じる。従って、遺伝学の能力は、細胞期脳の問題を有すると考えられ得る。

遺伝子発現および機能の示差的な化学分析は、細胞中の分子の複合体混合物が微量で存在する場合でさえも、それを分離(resolve)し得、定量し得、そして同定し得るツールを必要とする。しかしこの目的のための現在の分析化学的ツールは、それらの分野の各々で制限されている。1つの普及した生体分子分別 (separation) 法は電気泳動である。しばしば、ゲル中での等電点電気泳動による第1のタンパク質の分別は、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)による第2の分別と組み合わせられる。この結果は、タンパク質を等電点(正味の電荷)およびサイズ(すなわち質量)の次元に従って分離するマップである。しかしこの方法は有用ではあるが、いくつかの点で限界がある。第1に、この方法は生体分子のわずか2つの性質についての情報を提供するに過ぎない。質量および等電点(pI)である。第2に、各次元における分離はゲルの分離性によって制限される。例えば、その質量の差が約5%未満、または約0.5pI未満の分子はしばしば分離が困難である。第3に、ゲルはローディング受容量(capacity)能力が限られ、それゆえ選択性に限りがある。少量で発現される生体分子は検出され得ない。第4に、分子量が約10~20kDaを下回る小さいタンパク質およびペプチドは観察されない。

他の分析方法はこれらの限界の1つまたはそれ以上を克服し得るが、それらを効率的に組み合わせることは困難である。例えば、分析クロマトグラフィーは生体分子を種々の被分析物/吸着体相互作用に基づいて分別することができるが、多次元分析は困難であり、かつ時間がかかる。さらに、この方法は感受性に限界がある。

臨床的診断は疾患の既知のマーカーを特異的に検出する能力を必要とする。し

かし、このような診断の発展のためには、マーカーに特異的に結合する試薬を調製するのに必要とされる時間、または複合体混合物中のマーカーを識別し得る時間が障害となる。

薬物の発見は、リガンド/レセプター相互作用を調節する物質を迅速にスクリーニングする能力を必要とする。しばしば、このようなスクリーニングにおける律速段階はリガンド/レセプター相互作用を検出する能力である。従って、結合事象を同定するための迅速かつ特異的な方法は当該分野における進歩となる。

現在まで、潜在的なマーカーまたはリガンド/レセプター対のメンバーを同定するところから、このマーカーまたはメンバーに特異的に結合する物質を産生するまでのプロセスが困難である。1つの方法では、正常組織および疾患組織を比較して、疾患組織で上昇または減少しているmRNA種または発現配列タグ(「EST」)を同定する。これらの種を単離し、そしてこれらがコードするポリペプチドを組換えDNAの日常的方法を通じて産生する。次に、ポリペプチドを単離し、そしてマーカーに対して特異的な抗体を惹起する免疫原として使用する。この抗体を例えばELISAアッセイで用いて、患者の試料中のマーカーの量を決定する。

このプロセスは、長くそして退屈である。このような抗体を産生するために9ヶ月から1年かかり得、その時間の大半は免疫化のためのポリペプチドの十分量を単離するためのプロトコルを作成するために費やされる。さらに、この方法は、RNA発現の差異はタンパク質発現の差異として表されるという希望に頼る。しかし、この仮設は、常に信頼出来るわけではない。従って、示差的に発現されるタンパク質は直接検出される方法および特異のリガンドが優位に短い時間で産生され得る方法は、この分野にとって非常に利益である。

従って、生物体生体分子の複合体混合物を分離し、混合物中の個々の生体分子を同定し、そして1つまたはそれ以上の標的的分析物を含む特異的分子認識事象を同定するためのツールが、分析生化学、生物学および医学のために所望される。

#### 発明の要旨

本発明は被保持物(retentate)クロマトグラフィーのための装置および方法を提供する。被保持物クロマトグラフィーは組合せ的な方法であり、複合体混合物

中の被分析物の高度情報分離を、多次元分別方法の使用を通じて提供する。これは生物学および医学のために統合された被分析物検出および機能的分析の可能性を提供し、これは、遺伝子機能、タンパク質機能、細胞機能、および生物体全体の機能に関連する被分析物発現パターンの直接検出のための単一の一体化された操作システムによって特徴づけられる。1つの局面では、本発明は遺伝子機能、タンパク質機能、または巨大分子アセンブリ全体、細胞、および全生物体の発見または診断のための統合された操作システムを提供する。

より詳細には、被分析物は種々の二次元フォーマットで分離され得、それにより多次元情報が提供される。被分析物は最初に少なくとも2つの異なる第1の次元中で、少なくとも2つの異なる選択条件下で固定相に吸着するその能力(例えば、アニオン性/カチオン性ポテンシャル、疎水性/親水性、または特異的生体分子認識)に基づいて分別される。次に、被分析物は第2の次元で脱離スペクトロメトリ(例えば、レーザー脱離質量スペクトロメトリ)により質量に基づいて分別され、これにより分別された被分析物の検出がさらに提供される。被分析物が吸着する吸着体の性質は被分析物に関する物理化学的情報を提供する。

従って、本発明は分子発見および診断装置を提供する。これは並列かつ多重な被分析物の処理能力を含むことで特徴づけられる。被分析物が直接検出できるので、本発明は単一の単位操作の間に、同じ「サーキット」(すなわち、アドレス可能な「チップ」位置)から2つ以上の独立した標的被分析物シグナルを同時に発信することが可能である。

被保持物クロマトグラフィーはいくつかの点で従来のクロマトグラフィーと異なる。第1に、被保持物クロマトグラフィーでは、吸着体上に保持された被分析物が検出される。従来のクロマトグラフィー法では、被分析物は検出の前に吸着体から溶離している。従来のクロマトグラフィーにおいては、吸着体から溶離していない被分析物を検出するための日常的または簡便な手段は存在しない。従って、被保持物クロマトグラフィーは、保持された被分析物の化学的または構造的特性に関する直接的な情報を提供する。第2に、吸着クロマトグラフィーと脱離スペクトロメトリによる検出との組み合わせは、フェムトモルの範囲という驚くべき高感度と非常に優れた分離を提供する。第3に、一部には被分析物を直接検

出できるという理由で、被保持物クロマトグラフィーは種々の異なる選択条件で被保持物を迅速に分析する能力を提供し、それゆえ、試料中の被分析物の迅速な多次元の特徴付けを提供する。第4に、吸着体は、所定のアドレス可能な位置のアレイで基材に付着され得る。これにより、異なる溶離条件下でアレイ上の異なる吸着体部位(すなわち、「親和性部位」または「スポット」)に曝露される被分析物の並列処理が可能となる。

被保持物クロマトグラフィーは生物学および医学において多くの用途を有する。これらの用途としては、被分析物の組合せ的な生化学的分別および精製、示差的な遺伝子発現および分子認識事象の研究、診断および薬物発見が挙げられる。

被保持物クロマトグラフィーの、分析ツールとしての1つの基本的な用途は、試料を異なる吸着体/溶離物の組み合わせの組合せ的な取り合わせ(assortment)に曝露すること、および異なる条件下での被分析物の挙動を検出することを含む。これにより、被分析物が精製され、そして試料中の被分析物の検出のために有用な条件が同定される。このようにして同定された吸着体を有する基材は、1つまたは複数の被分析物の特異的検出器として使用され得る。進行的な抽出法においては、試料を第1の吸着体/溶離物の組み合わせに曝露し、そして第1の吸着体によって吸着された被分析物が枯渇した洗浄液を第2の吸着体に曝露して、他の被分析物を枯渇させる。被分析物を保持するものとして同定される選択条件はまた分取的精製手順にも用いられ得る。この手順では、被分析物を含む不純試料をその被分析物を保持する吸着体に連続的に曝露し、不純物を除去し、そして保持された被分析物を次のラウンドで吸着体から採取する。

本発明の1つの局面は、アレイ内のアドレス可能な位置の個々の選択条件によって特徴づけられる各クラスまたは型の分子認識事象(例えば、標的吸着体-標的被分析物の相互作用)が直接検出され、その間、関連する分子がアドレス可能な位置にそれでもなお局在化(すなわち「保持」)されていることである。すなわち、直接的手段による選択および検出は、標的被分析物の溶離、回収、増幅、または標識化を必要としない。

本発明の他の局面は、アドレス可能なアレイ内の1つ以上の位置での1つ以上の所望の分子認識事象の検出が、少なからぬ量の総吸着体-被分析物の画分の除

去

または消費を必要としないことである。それゆえ、非使用の部分は、構造および機能の解明のためにインサイチュで(すなわちアドレス可能な位置の境界内で)直接行われる1つ以上の「二次的処理」(さらなるアセンブリ(assembly)またはジアセンブリ(diassembly)、修飾、または増幅(直接または間接)の後に、さらに問い合わせ(interrogate)され得る。

被分析物に対しての特異性が向上した吸着体は、「進行的分離(progressive resolution)」と呼ばれる中間的なプロセスによって開発され得る。このプロセスでは、被分析物を保持することが証明された吸着体または溶離物をさらなる変数で試験して、より優れた結合特性の組み合わせが同定される。他の方法では、被分析物に特異的な抗体吸着体を有する基材の迅速な作製が可能となる。この方法は、被分析物を吸着体にドッキングすること、およびファージ提示ライブラリーを被分析物に結合するファージについてスクリーニングすることを伴う。

被保持物クロマトグラフィーはまた、分子生物学および細胞生物学における用途も有する。2つの試料中に示差的に存在する被分析物(例えば2つの細胞抽出物中に示差的に発現するタンパク質)は、試料を脱離スペクトロメトリによる分析のための種々の吸着体/溶離物の組み合わせに曝露することによって同定され得、これにより、他の分別および検出系ではかなうことができないこの系の高度情報分離能力が利用できる。未知の標的タンパク質は、吸着体/溶離物の組み合わせの化学的性質に基づいて物理化学的性質(分子量を包含する)を決定することによって同定され得、そしてこの情報を用いて同様のプロファイルを有するタンパク質についてデータベースをスクリーニングし得る。

分別生化学における方法およびこれらの方法から生成される吸着体は診断において有用である。より詳細には、化学的な吸着体または生体特異的な吸着体のいずれかが、重要な診断的マーカーの検出のために開発され得る。特定の実施態様において、基材は、疾患または症候群のための診断的なマーカーの組み合わせについて選択された吸着体スポットのアレイを有し得る。

被保持物クロマトグラフィーはまた薬物発見において有用である。レセプター

／リガンド対の1つのメンバーを吸着体にドッキングし、そして結合パートナーに結合するその能力を物質(agent)の存在下で試験する。吸着が迅速に試験され

得るので、物質の組合せ的なライブラリーは相互作用を調節するその能力について容易に試験され得る。

本発明の1つの局面では、試料中の少なくとも1つの被分析物の高度情報分離のための方法を提供する。この方法は、複数の被分析物の並列な分別および検出を含む組合せ的な分別方法である。この方法は、a)被分析物を少なくとも2つの異なる選択条件に曝露する工程であって、各選択条件が吸着体および溶離物の組み合わせによって規定され、この被分析物を吸着体で保持させる、工程；およびb)異なる選択条件下で保持された被分析物を脱離スペクトロメトリで検出する工程を包含する。異なる選択条件下での保持された被分析物の検出は、被分析物の高度情報分離を提供する。

1つに実施態様においては、異なる選択条件の各々は、並列処理のための異なる所定のアドレス可能な位置で定義される。他の実施態様においては、この方法は、i)被分析物を定義された位置で第1の選択条件に曝露して、被分析物を吸着体で保持させる工程；ii)第1の選択条件下で保持された被分析物を脱離スペクトロメトリによって検出する工程；iii)吸着体を定義された位置で第2の異なる選択条件下で洗浄して、被分析物を吸着体で保持させる工程；およびiv)第2の選択条件下で保持された脱離スペクトロメトリによって検出する工程を包含する。

他の実施態様において、被分析物は生物体生体分子、多量体分子複合体または巨大分子構築物である。他の実施態様において、生物体生体分子は酵素、免疫グロブリン、細胞表面レセプターまたは細胞内レセプターである。

他の実施態様において、吸着体はアニオン、カチオン、疎水性相互作用吸着体、ポリペプチド、核酸、炭水化物、レクチン、色素、還元剤、炭化水素またはそれらの混合物を含む。他の実施態様において、吸着体は、ガラス、セラミック、磁性材料、生物体ポリマー、伝導性ポリマー、天然バイオポリマー、金属または生物体ポリマーでコートされた金属を含む基材に付着する。他の実施態様において、吸着体は、マイクロ乳濁液、ラテックス、ビーズの層の形態であり得る。他の

実施態様において、基材上の位置は線状または直交アレイに配置される。他の実施態様において、吸着体は被分析物が選択条件に曝露される前に基材上に異なる位置で配置される。他の実施態様において、吸着体は被分析物が選択条件に曝露され

た後に基材上に異なる位置で配置される。他の実施態様において、異なる選択条件は異なる結合条件または異なる溶離条件を含む。

他の実施態様において、検出工程は被分析物の質量をレーザー脱離質量スペクトロメトリで検出する工程を包含する。

他の実施態様において、選択条件は吸着体による被分析物の保持を最適化すべく選択される。他の実施態様において、少なくとも1つの被分析物は1つより多い被分析物である。他の実施態様において、複数の選択条件が異なる吸着体および同じ溶離物で定義される。

他の実施態様は、アドレス可能な位置に吸着体を含む基材を提供する工程をさらに包含し、各吸着体は被分析物の保持を同定する選択条件による吸着体である。他の実施態様において、溶離条件はpH、緩衝能、イオン強度、水構造特性、界面活性剤の型、界面活性剤強度、疎水性または比誘電率に従って異なる。他の実施態様において、複数の選択条件が同じ溶離物によって規定される。

他の実施態様において、本発明は試料から被分析物を系列的に抽出する方法を提供する。これは、並列な複数の被分析物のための組合せ的な系列分別および精製展開方法(purification development method)である。この方法は、a)被分析物を含む試料を第1の選択条件に曝露して、被分析物を第1の吸着体に保持させ、そして非保持試料を作製する工程；b)被分析物を含む非保持試料を採取し、非保持試料を第2の選択条件に曝露して、被分析物を第2の吸着体に保持させ、そして非保持試料を作製する工程；およびc)異なる選択条件下で保持された被分析物を脱離スペクトロメトリで検出する工程を包含する。

他の局面において、本発明は脱離スペクトロメトリのための基材を提供し、これは吸着体を含み、この吸着体の結合特性は1つ以上の直線軸に沿う勾配で変化する。



他の局面において、本発明は、試料中の被分析物に対する分離が改善された選択条件を進行的に同定する方法を提供する。この方法は以下の工程を含む：(a) 試料中の被分析物を保持する選択条件を以下の工程(i)~(iii)で同定する工程：(i)試料を選択条件のセットに曝露する工程であって、各選択条件が少なくとも1つの結合特性および少なくとも1つの溶離特性によって定義される、工程；(ii)

各選択条件下で保持された被分析物を脱離スペクトロメトリで検出する工程；および(ii)被分析物を保持する選択条件を同定する工程；ならびに(b)被分析物に対する改善された分離を有する選択条件を以下の工程(i)~(iii)によって同定する工程：(i)少なくとも1つの結合特性または溶離特性を同定された選択条件から選択し、そしてそれを選択性特性の定常のセットに加える工程；(ii)改変された選択条件のセットに試料を曝露する工程であって、ここで改変されたセット中の各選択条件が以下を含む工程：(1)定常セットにおける選択性特性および(2)定常セットにおいてではない結合特性または溶離特性；および(iii)改変されたセットからの選択条件を先に同定された選択条件と比べて改善された分離を有する被分析物を保持する脱離スペクトロメトリによって同定する工程。1つの実施態様は、工程(b)を少なくとも1回繰り返す工程を包含する。他の実施態様は、工程(b)を、選択条件が試料から標的的被分析物のみを保持することが同定されるまで繰り返す工程を包含する。

他の局面において、本発明は、進行的分離方法によって被分析物を分離するものとして同定された選択条件による吸着体を含む、脱離スペクトロメトリのための基材を提供する。1つの実施態様において、基材はキットの形態で与えられ、このキットはさらに、選択条件による溶離物、または溶離物を吸着体と組み合わせて使用する指示を含む。

他の局面において、本発明は不純試料からの被分析物の分取的精製のための方法を提供する。この方法は、以下の工程を包含する：a)試料を複数の異なる選択条件下で基材に曝露する工程；脱離スペクトロメトリにより異なる選択条件下で、保持された被分析物を検出する工程；および被分析物が保持される選択条件を同定する工程；(b)被分析物を、複数の異なる同定された選択条件について以下

のi)~iii)を包含する一連の工程を繰り返すことによって精製する工程；i)試料を、同定された選択条件下、吸着体に曝露して被分析物を吸着体によって保持させる工程；ii)被分析物を基材によって保持されない不純物から分別する工程；およびiii)被分析物を吸着体から採取する工程。

他の局面において、本発明は試料中の少なくとも1つの被分析物を検出するための基材を調製するための方法を提供する。この方法は、被分析物特異的吸着体

の設計および同定のための組合せ的な方法である。これは標的被分析物の検出において有用である。この方法は、a)試料を少なくとも2つの異なる選択条件に曝露する工程であって、各選択条件が吸着体と溶離物との組み合わせによって規定され、被分析物を吸着体により保持させる工程；b)被分析物が保持されるもとで少なくとも1つの選択条件で脱離スペクトロメトリによって同定する工程；およびc)同定された選択条件の少なくとも1つの吸着体を含む基材を調製する工程を包含する。1つの実施態様において、同定工程は、複数の被分析物が保持されるもとで少なくとも1つの選択条件を同定する工程を包含する。他の実施態様において、調製工程は、ある溶離条件下で被分析物を多重な吸着体として保持する複数の吸着体を含む基材を調製する工程を包含する。

他の局面において、本発明は被験体において、少なくとも1つの診断マーカーで特徴づけられる疾患を診断する方法を提供する。これは、複数の診断マーカーの同時検出のための組合せ的な方法である。この方法は、a)脱離スペクトロメトリで使用するための基材を提供する工程であって、この基材が少なくとも1つのアドレス可能な位置を含み、各アドレス可能な位置が、ある溶離条件下少なくとも1つの診断マーカーを分離する吸着体を含む、工程；b)基材を、その溶離条件下、被験体からの生物学的試料に曝露して、診断マーカーを保持させる工程；およびc)保持された診断マーカーを脱離スペクトロメトリで検出する工程、を包含する。保持された診断マーカーの検出は疾患の診断を提供する。

他の局面において、本発明は試料中の被分析物を検出するためのキットを提供する。このキットは、(1)脱離スペクトロメトリで使用するための基材であって、少なくとも1つのアドレス可能な位置を含み、各アドレス可能な位置が、吸着

体および溶離物を含む選択条件下で被分析物を分離する吸着体を含む、基材；および(2)試料をこの選択条件に曝露するための溶離物または指示、を含む。1つの実施態様において、キットは、複数の診断マーカー、および複数のアドレス可能な位置を含む基材により特徴づけられ、各アドレス可能な位置は少なくとも1つの診断マーカーを分離する吸着体を含む。

他の局面において、本発明は、脱離スペクトロメトリのための基材を提供する。この基材は少なくとも1つの吸着体を少なくとも1つのアドレス可能な位置に含み、

ここでこの少なくとも1つの吸着体は、患者試料から病理学的条件についての複数の診断マーカーを分離する。

他の局面において、本発明は、被分析タンパク質について同一候補を選択する方法を提供する。この方法は、少なくとも2つの物理化学的特性に基づくタンパク質同定のための組合せ的な方法である。この方法は以下の工程を包含する：a) 試料中のタンパク質被分析物の少なくとも第1および第2の物理化学的性質についてのマッチパラメータを特定する値のセットを、以下の工程i)およびii)によって決定する工程：1)被分析物を複数の異なる選択条件に曝露する工程であって、ここでタンパク質被分析物と基材との吸着がタンパク質被分析物の物理化学的性質を同定する引力 (attraction) に基づいて媒介される、工程；およびii)異なる選択条件下、保持された被分析物を脱離スペクトロメトリによって検出する工程；およびb)プログラム可能なデジタルコンピュータで以下の工程i)~iii)を実行する工程：i)参照ポリペプチドの1つのセットの各メンバーについて、この参照ポリペプチドの少なくとも第1および第2の物理化学的性質を特定する値のセットを含むデータベースにアクセスする工程；ii)タンパク質被分析物の物理化学的性質を特定する値のセットを入力する工程；iii)マッチパラメータ内の値のセットを有する参照ポリペプチドをデータベースからソートする工程。ソートされた参照ポリペプチドはタンパク質被分析物についての同一候補を提供する。非ソートの参照ポリペプチドは同一候補から除外されたポリペプチドである。

他の局面において、本発明は、被分析物を系列的に保持するための方法を提供

する。この方法は、多量体の巨大分子または超分子アセンブリのモニタリング方法である。これは分子認識妨害による薬物発見のための方法として有用である。この方法は、a)第1試料を一次吸着体および溶離物に曝露して、第1被分析物をこの吸着体によって保持させ、そして吸着した被分析物を脱離スペクトロメトリによって検出して、これにより保持された第1被分析物が二次吸着体になる工程；b)第2試料を二次吸着体および溶離物に曝露して、第2被分析物を二次吸着体で保持させ、そして吸着した第2被分析物を脱離スペクトロメトリによって検出して、これにより保持された第2被分析物が三次吸着体になる工程、を包含する。

他の局面において、本発明は、試料中の酵素を検出する方法を提供する。この

方法は：a)吸着体およびこの吸着体に結合した酵素基質を含む固相を提供する工程であって、ここで酵素基質上の酵素の活性により特徴的な分子量を有する産物が産生される工程；b)基質を試料に曝露する工程；およびc)脱離スペクトロメトリによって産物を検出する工程、を包含する。産物の検出により酵素の検出が提供される。

他の局面において、本発明は被分析物が第1および第2の生物学的試料中に示差的に存在する(例えば示差的に発現される)かどうかを決定するための方法を提供する。この方法は、示差的遺伝子発現を示差的タンパク質提示によってモニタリングするための組合せ的な方法として有用である。この方法は：a)第1試料中の被分析物についての第1保持マップを少なくとも1つの選択条件について決定する工程；b)第2試料中の被分析物についての第2保持マップを同じ選択条件について決定する工程；およびc)第1保持マップおよび第2保持マップ間の差異を検出する工程、を包含する。保持マップ間の差異は、被分析物が第1試料および第2試料中で示差的に存在することの決定を提供する。

1つの実施態様において、この方法は、タンパク質が、2つの異なる細胞間、およびこの細胞またはこの細胞由来の物質を含む第1および第2の試料間で示差的に発現するかどうかを決定するための方法である。他の実施態様において、この方法は、ある物質が生物学的試料中のタンパク質の発現を変化させるかどうかを決定するための方法であるならば、この物質を第1の生物学的試料に投与するが第2

の生物学的試料に投与しない工程を包含する。他の実施態様において、第1の生物学的試料は健康な被験体由来であり、そして第2の生物学的試料は病理学的状態に罹患した被験体由来である。試料は、例えば、血液、尿、血清および組織から選択され得る。病理学的被験体由来の試料において増加することが見いだされる被分析物が診断マーカーの候補である。一般に、診断マーカーの確認は多くの被験体からマーカーを検出することを含む。

他の局面において、本発明はレセプターに対するリガンドを同定するための方法を提供する。この方法は：a)吸着体を含む基材を提供する工程であって、ここでレセプターが吸着体に結合する、工程；b)結合したレセプターを、レセプターとリガンドとの間を結合させる条件下、リガンドを含む試料に曝露する工程；お

よびc)結合したリガンドを脱離スペクトロメトリで検出する工程、を包含する。

他の局面において、本発明はある物質が標的被分析物と吸着体との間の結合を調節するかどうかを決定するためのスクリーニング方法を提供する。これは薬物発見のための組合せ的な方法である。この方法は：a)ある溶離条件下で標的被分析物が結合する吸着体を含む基材を提供する工程；b)基材を標的被分析物および上記物質に上記溶離条件下で曝露して、標的被分析物と吸着体との間を結合させる工程；c)標的被分析物と吸着体との間の結合の量を脱離スペクトロメトリで検出する工程；およびd)測定した量が、基材を上記物質なしの溶離条件下、標的被分析物に曝露した場合のコントロール結合量と異なるかどうかを決定する工程、を包含する。測定量とコントロール量との間の差異は、この物質が結合を調節することを示す。

1つの局面において、本発明は、標的吸着体に特異的に結合するポリペプチド物質をコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子パッケージを検出する方法を提供する。これは、1つの局面において、被分析物特異的ファージを提示ライブラリーから選択するための組合せ的な方法であり、被保持物マッピングによって単離された標的タンパク質またはインビボ転写および翻訳によりインサイチュで生成された標的タンパク質の使用を包含する。この方法は：a)標的吸着体を含む基

材を提供する工程；b)複数の異なる遺伝子パッケージを含む提示ライブラリーを提供する工程であって、異なる遺伝子パッケージの各々がポリペプチド物質をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含み、そして異なる遺伝子パッケージの各々が、コードされたポリペプチド物質が提示される表面を有する、工程；c)基材を溶離条件下で提示ライブラリーに曝露して、ポリペプチド物質と標的吸着体との間を特異的結合させる工程であって、これによりポリペプチド物質を含む遺伝子パッケージが基材上に保持される工程；およびd)基材上に保持された遺伝子パッケージを脱離スペクトロメトリによって検出する工程。

本発明の1つの実施態様において、提示ライブラリーはファージ提示ライブラリーである。他の実施態様において、ファージはM13である。他の実施態様において、ポリペプチドは単鎖抗体である。他の実施態様において、標的被分析物は、異なる表現型の細胞間で示差的に発現されるポリペプチド被分析物である。他の

実施態様において、基材は細胞または細胞表面を含む。

1つの実施態様において、標的被分析物を含む基材を提供する工程は：i)吸着体を含む基材を提供する工程であって、ここで吸着体が標的被分析物のある溶離条件下で保持する、工程；およびii)吸着体を上記溶離条件下、標的被分析物に曝露して、標的被分析物を吸着体によって保持させる工程であって、ここで標的被分析物が標的吸着体になる工程、を包含する。1つの実施態様において、標的被分析物は標的ポリペプチドであり、そして吸着体を曝露する工程ii)は、標的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのインビトロ翻訳によって標的ポリペプチドをインサイチュで吸着体上に産生する工程を包含し、そしてさらにポリヌクレオチド配列をインサイチュで基材上で増幅する工程を包含し得る。

他の実施態様において、基材は：(1)固定化(anchoring)ポリペプチドに結合する吸着体、および(2)固定化ポリペプチドを提示する表面を有する少なくとも1つの標的遺伝子パッケージを含み、この標的遺伝子パッケージは標的吸着体をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含み、ここで標的遺伝子パッケージは固定化ポリペプチドを介して吸着体に結合する。

他の実施態様において、この方法はさらに以下の任意の工程を包含する：ポリペプチド物質をコードするヌクレオチド配列を配列決定する工程；保持された遺伝子パッケージを単離する工程またはポリペプチド物質を産生する工程。

他の局面において、本発明は脱離スペクトロメトリのための基材を提供し、この基材は遺伝子パッケージの表面上に提示された固定化ポリペプチドに結合する吸着体を含み、ここで遺伝子パッケージの表面はさらに標的ポリペプチドを提示し、そしてここで遺伝子パッケージは標的ポリペプチドをコードするヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む。

他の局面において、本発明はポリヌクレオチドの翻訳を検出するための方法を提供する。この方法は：a) 脱離スペクトロメトリで使用するための吸着体を含む基材を提供する工程；b) 基材を、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、およびポリヌクレオチドのインビトロ翻訳のための物質と接触させる工程であって、ここでポリペプチドが産生される、工程；c) 基材を溶離物に曝露して、ポリペプチドを吸着体によって保持させる工程；およびd) 保持されたポリペプチドを

脱離スペクトロメトリによって検出する工程、を包含する。ポリペプチドの検出により、ポリヌクレオチドの翻訳の検出が提供される。

#### 図面の簡単な説明

図1は、ストリップの形状に複数の吸着スポットを含む基材を示す。このストリップは引力(疎水性、イオン性、配位共有、および混合機能)を基準にして分類される6つの異なるセットの吸着剤を含む。このストリップは、各型の吸着体ごとに数個のスポットを含み、これらのスポットは異なる溶離物で異なる時点に問い合わせることを可能とし、あるいはこれらのスポットは記録および次の分析のためである。

図2は、所定のアドレス可能な位置での吸着体(表面相互作用ポテンシャル)の直交アレイを示す。アレイはまたプレートの形状をとり得る。アレイは種々の吸着体を含む。被分析物に曝露すると、各ストリップは種々の溶離物(選択性閾値調節物)で洗浄され得る。異なる選択条件下で保持される被分析物により、保持マップまたは認識プロファイルが得られる。

図3は、アレイ上の所与の位置からの被分析物の脱離による被分析物の定量分析、および脱離した被分析物のレーザー脱離質量スペクトロメトリによる定量的検出を表す。

図4Aは、本発明によって生成されるデータを分析するために使用され得るソフトウェアを実行するために使用されるコンピュータシステムの例を示す。図4Aはコンピュータシステム1を示し、これはモニター3、スクリーン5、キャビネット7、キーボード9、およびマウス11を含む。マウス11はマウスボタン13のような1つ以上のボタンを有し得る。キャビネット7はCD-ROMドライブ15およびハードドライブ(図示せず)を収納し、これは本発明を取り入れたコードを含むコンピュータプログラムを記録し、そして検索するために利用され得る。CD-ROM17がコンピュータで読みとり可能な記憶媒体として図示されるが、コンピュータで読みとり可能な他の記憶媒体(フロッピーディスク、DRAM、ハードドライブ、フラッシュメモリ、テープなどを包含する)も利用され得る。キャビネット7はまた、プロセッサ、メモリなどの普通のコンピュータ構成要素(図示せず)も収納する。

図4Bは、本発明で生成するデータを分析するために使用され得るソフトウェアを実行するために使用されるコンピュータシステム1のシステムブロックダイアグラムを示す。図4Aに示すように、コンピュータシステム1は、モニター3およびキーボード9を含む。コンピュータシステム1はさらに、セントラルプロセッサ102、システムメモリ104、I/Oコントローラ106、ディスプレイアダプタ108、リムーバブルディスク112、固定ディスク116、ネットワークインターフェース118、およびスピーカ120のようなサブシステムを含む。リムーバブルディスク112は、フロッピー、テープ、CD-ROM、リムーバブルハードドライブ、フラッシュメモリ等のようなリムーバブルなコンピュータで読みとり可能な媒体を代表する。固定ディスク116は内部ハードドライブ、DRAMなどを表す。本発明での使用に適した他のコンピュータシステムは、追加の、あるいはより少ないサブシステムを含み得る。例えば、他のコンピュータシステムは1つより多くのプロセッサ102(すなわち、マルチプロセッサシステム)またはメモリキャッシュを含み得る。

図5A-5Fは、6つの異なる吸着体および数個の異なる溶離物を含む選択条件下で



のリゾチームの保持マップを示す。

図6A-6Bは、固定化金属吸着体によるヒト血清中の被分析物の低分子量および高分子量での分離を示す。

図7A-7Bは、同じ溶離物を用いての種々の吸着体によるヒト血清中の被分析物の低分子量および高分子量での分離を示す。

図8A-8Bは、水を溶離物として用いての種々の吸着体による早期児の尿の低分子量および高分子量での分離を示す。

図9は、疎水性フェニル吸着体および3つの異なる溶離物を用いた初期小児尿中の被分析物の分離を示し、その結果、1つの被分析(\*)物がTween洗浄条件で選択的に保持されることが発見された。

図10A-10Dは、2つの異なる乳ガン細胞株の細胞培養培地中の被分析物の分離を示す。

図11は、6つの異なる吸着剤および3つの異なる溶離物によって定義される選択条件に曝露された早期児尿の複合保持マップを示す。

図12は、早期児尿の二次元ポリアクリルアミドゲル(pIおよび見かけ上の分子量)を示す。

図13は、標的被分析物に特異的に結合する表面タンパク質を有するファージについてのファージ提示ライブラリーでのパニング法を示す。上に示す基材は、ほんのわずかの特異的に結合するファージでさえも、そのファージが含む多くのコートタンパク質の検出によって脱離スペクトロメトリで検出され得ることを示す。下では、いくつかの吸着体スポットを有する基材が、標的被分析物が特異的に結合されるように開発される。ファージはこれらのスポットに曝露される。結合したファージが脱離スペクトロメトリによって検出される。他のスポットに結合したファージは単離され得、そして増殖され得る。

図14は、タンパク質-タンパク質相互作用の研究で使用するための標的タンパク質をドッキングするために、パニング法で同定されたりガンド物質(この場合には一本鎖抗体)をどのようにして吸着体として用い得るかを示す。標的はインサイチュで精製され(スポット2)、そしてファージ提示ライブラリーをパニング

するために使用される(スポット4)。一本鎖抗体を単離し、そして基材(スポット6)に吸着体として付着させる。次いで、標的が一本鎖抗体に吸着される。この標的がここで、タンパク質-タンパク質相互作用の研究のためにドッキングされる(スポット8)。

図15は、薬物候補を、タンパク質のリガンド(この場合には一本鎖抗体)への結合を妨害する能力についてスクリーニングするための方法を示す。標的タンパク質に対して特異的な一本鎖抗体を、例えば、それ自体がタンパク質Aまたはタンパク質Gを介してドッキングされ得る抗ファージ抗体を介して、基材上のスポットにドッキングさせる。一本鎖抗体を標的タンパク質および薬物候補に曝露する。薬物が被分析物タンパク質に結合する能力、およびリガンドと被分析物との結合を妨害する能力を、脱離スペクトロメトリーでモニターする。

図16は、薬物候補を、タンパク質とリガンドとの結合を妨害する能力についてスクリーニングするための方法を示す。この方法は、薬物が、それ自体がリガンドと結合することによって被分析物の結合を妨害する能力を脱離スペクトロメトリーでモニターすること以外は、前図に示した方法と同様である。

図17は、薬物候補を、標的タンパク質(標的タンパク質I)と二次的リガンド(標的タンパク質II)との結合を妨害する能力についてスクリーニングするための方法を示す。前の2つの図のように、標的は基材とドッキングしてそれ自体がリガンドの吸着体となる。この場合、被分析物は一本鎖抗体を介してドッキングされる。次いで、標的をリガンドおよび薬物候補に曝露する。薬物が、被分析物とリガンドとの間の結合を(例えば、標的被分析物に結合することによって)妨害する能力を、脱離スペクトロメトリーでモニターする。

図18は、示差的に発現されるmRNAまたはポリペプチドの同定から始まり、脱離スペクトロメトリーによる検出のためのポリペプチドを特異的に結合するための診断プラットフォームの作製に終わる、フローチャートを示す。

図19A-19Dは、吸着体アレイ上のHemophilus溶解物の保持マップを示す。図19A：アニオン性吸着体；図19B：順相吸着体；図19C：Ni(II)吸着体；図19D：疎水性吸着体。

図20A-20Cは、Hemophilus溶解物中の被分析物の進行的分離を示す。各場合の吸着体はアニオン性吸着体である。図20A：第1工程において、試料を曝露した後、スポットを $150\mu\text{l}$ の20mMリン酸ナトリウム、0.5M塩化ナトリウム、pH7.0で洗浄した。第2工程において、吸着体および溶離物のリン酸ナトリウム特性を特性の定常セットに加えた。新規の溶離特性を加えた。図20B：20mMリン酸ナトリウム、pH7.0に加えて、スポットを0.05% Triton X100および0.15M NaCl(全体で $150\mu\text{l}$ )で洗浄した。図20C：20mMリン酸ナトリウム、pH7.0に加えて、スポットを100mMイミダゾール、0.15M NaCl(全体で $150\mu\text{l}$ )で洗浄した。

図21A-21Dは、正常ヒト血清および疾患血清中の成分間の比較の結果を示す。図21A：吸着体アレイ Cu(II)部位上の正常血清の保持マップ。図21B：吸着体アレイ Cu(II)部位上の疾患血清の保持マップ。図21C：両血清試料の保持被分析物を重ね合わせ様式で組み合わせられる。表示を単純化するために、保持被分析物の各ピークを直線に変換し、点線が正常血清から保持された被分析物を表し、そして実線が疾患血清から保持された被分析物を表す。図21D：2つの試料間の差異をよりはっきりと識別するために、比較プロットを作製する。ここで試料から保持された被分析物の比を計算し、そして示した。「\*」でマークされた2つの被分析物が<sup>1</sup>、疾患血清中の有意な増加を示す(5~10倍の増加)。

図22A-22Dは、コントロール、疾患、および薬物処置されたマウスの尿のCu(II)吸着体上での保持マップの比較、ならびに疾患および薬物処置尿中のマーカーの量の定量を示す。

図23A-23Dは、「ゲルビュー(gel view)」フォーマットで示される、4人のヒトガン患者からの尿中の被分析物の保持マップを示す。患者1、2および3の間の示差マップは、これらの患者において増大した量が存在する2つの共通の被分析物を示す。

図24A-24Eは、レーザー脱離質量スペクトロメトリによる、遺伝子VIIIコトタンパク質の検出を通じてのM13ファージの検出を示す。オリジナルの $10^{12}$ ファージ/ $\text{ml}$ の希釈は1:10から1:100,000,000の範囲である。

図25A-25Bは、吸着体として抗M13抗体を用いての脱離スペクトロメトリによる

M13の捕捉を示す。図22Aは遺伝子VIIIおよび遺伝子IIIタンパク質を表すピークによるM13ファージの捕捉を示す。図22Bは、抗体吸着体(一重(singly)および二重(doubly)チャージ)を示すピークを示すコントロールである。

図26A-26Dは、抗tat一本鎖抗体を有するM13ファージの、tatタンパク質吸着体による吸着を示す。単一の強度を1:10から1:10,000のファージ希釈下で示す。

図27A-27Bは、ドッキングしたTGF- $\beta$ レセプター融合タンパク質に結合したTGF- $\beta$ の、1  $\mu$ g/ml(図27A)および100ng/ml(図27B)での保持マップを示す。実線は遊離のTGF- $\beta$ レセプターの非存在下での結合を示す。点線はTGF- $\beta$ レセプターの存在下での結合を示す。

図28から31は、被保持物クロマトグラフィーの分離能力を示す。図28A-28Cは、疎水性、カチオン性、およびCu(II)吸着体を用いたHemophilus溶解物からのタンパク質の分離を、0kDから30kDの分子量で示す。各保持被分析物は直線で示され、直線の高さは保持被分析物の強度を示す。図29A-29Cは、疎水性、カチオン性、およびCu(II)吸着体を用いたHemophilus溶解物からのタンパク質の分離を、約30kDから約100kDの分子量で示す。図30は、3種の吸着体の各々による0kDから30kDのHemophilusタンパク質から組み合わせた分離を示す。図31は、3種の吸着体の各々による20kDから100kDのHemophilusタンパク質から組み合わせた分離を示す。

図32は、GST融合タンパク質と順相吸着体との結合を示す。

図33A-33Bは、特異的リガンドと、吸着剤アレイにドッキングしたGST融合レセプターとの結合(図33A)、およびリガンドとGST融合レセプターを含まないコントロールアレイとの結合が存在しないこと(図33B)を示す。

#### 発明の詳細な説明

##### 1. 定義

特に指示のない限り、本明細書中で使用される全ての技術および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者に普通に理解される意味を有する。以下の参考文献は、当業者に、本発明で使用する多くの用語の一般的な定義を提供する。Singletonら、DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY(第2版、199

4); THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY(Walker編, 1988); THE GLOSSARY OF GENETICS第5版, R. Riegerら(編), Spring Verlag(1991); および Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY(1991)。本明細書において、以下の用語は特に指示のない限り、これらに依る意味を有する。

「被分析物」は、望ましくは保持され、そして検出される、試料の成分をいう。この用語は試料中の単一の成分または成分のセットをいい得る。

「吸着体」は、被分析物を吸着し得る任意の材料をいう。用語「吸着体」は本明細書において、被分析物が曝露される単独の材料(「モノプレックス吸着体」)(例えば、化合物または官能基)、および試料が曝露される複数の異なる材料(「マルチプレックス吸着体」)の両方をいう。マルチプレックス吸着体中の吸着体材料を「吸着体種」という。例えば、基材上のアドレス可能な位置は、異なる結合特性を有する多くの異なる吸着体種(例えば、アニオン交換材料、金属キレート剤、または抗体)で特徴づけられるマルチプレックス吸着体を含み得る。

「吸着」は、溶離物(選択性閾値調節剤)での洗浄の前または後のいずれかの、吸着体と被分析物との間の検出可能な結合をいう。

「基材」は吸着体が付着または堆積する固体相をいう。

「結合特性」は、吸着体の被分析物に対する引力を決定する化学的および物理的特徴をいう。2種の吸着体は、もし同一の溶離条件下で同じ被分析物を異なる

親和性の程度で結合する場合、異なる結合特性を有する。結合特性としては、例えば、塩で促進される相互作用の程度、疎水性相互作用の程度、親水性相互作用の程度、静電的相互作用の程度、および本明細書で記載される他のものが挙げられる。

「結合条件」は、被分析物が曝露される結合特性をいう。

「溶離物」は、被分析物の吸着体への吸着を媒介するために使用される物質(agent)(典型的には溶液)をいう。溶離物はまた「選択性閾値調節剤」とも称される。

「溶離特性」は、特定の溶離物(選択性閾値調節剤)が被分析物と吸着体との間の吸着を媒介する能力を決定する特徴をいう。2つの溶離物は、被分析物および

吸着体と接触させたときに、被分析物の吸着体に対する親和性の程度が異なる場合、異なる溶離特性を有する。溶離特性としては、例えば、 $\text{pH}$ 、イオン強度、水構造の改変、界面活性剤強度、疎水性相互作用の改変、および本明細書で記載される他のものが挙げられる。

「溶離条件」は、被分析物が曝露される溶離特性をいう。

「選択性特性」は、特定の結台特性を有する吸着剤と特定の溶離特性を有する溶離物との組み合わせの特徴をいい、これは溶離物で洗浄した後に吸着体に保持される被分析物の特異性を決定する。

「選択条件」は、被分析物が曝露される選択性特性をいう。

「引力 (attraction) の基準」は、1つの分子が他の分子に引きつけられることを生じさせる化学的および/または物理化学的特性をいう。

「引力の強度」は、他の分子に対する1つの分子の引力の強さをいう(親和性としても知られる)。

「分離する(resolve)」、「分離(resolution)」または「被分析物の分離」は、試料中の少なくとも1つの被分析物の検出をいう。分離は、試料中の複数の被分析物を分別し、そして次に示差的に検出することによる検出を包含する。分離は、被分析物を混合物中の他の被分析物から完全に分別することを必ずしも必要としない。むしろ、少なくとも2つの被分析物の間の識別を可能とする任意の分別であれば十分である。

「情報高度分離」は、単に被分析物のみならず、評価される被分析物の少なくとも1つの物理化学的特性(例えば、分子量)を検出する様式での被分析物の分離をいう。

「脱離スペクトロメトリー」は、被分析物の検出方法をいう。ここで被分析物は被分析物を固定相から気相に脱離させるエネルギーに曝露され、そして脱離した被分析物またはその識別可能な部分は、被分析物を第2の固定相上に捕捉する中間的工程を経ることなく、検出器で直接検出される。

「検出」は、検出されるべき目的物の存在、非存在、または量を同定することを用いる。

「保持」は、溶離物で洗浄した後に被分析物の吸着体による吸着をいう。

「保持データ」は、特定の選択条件下で保持される被分析物の検出(必要に応じて、質量の検出を包含する)を示すデータをいう。

「保持マップ」は、複数の選択条件下で保持される被分析物についての保持データを特定する値のセットをいう。

「認識プロファイル」は、複数の選択条件下での被分析物の相対的保持を特定する値のセットをいう。

「複合体」は、2つ以上の被分析物の連合によって形成される被分析物をいう。

「フラグメント」は、被分析物の化学的、酵素的、または物理的分解による生成物をいう。フラグメントは中性またはイオン状態であり得る。

「示差的発現」は、被分析物の質的または量的存在における、検出可能な差異をいう。

「生物学的試料」は、ウイルス、細胞、組織、器官または生物由来の試料であり、細胞、組織または器官の溶解物またはホモジネート、あるいは体液試料、例えば、血液、尿または脳脊髄液を包含するがこれらに限定されない。

「有機生体分子」は、生物学的起源の有機分子をいい、例えば、ステロイド、アミノ酸、ヌクレオチド、糖、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、複合炭水化物または脂質をいう。

「小有機分子」は、薬学で一般的に用いられる有機分子のサイズに匹敵するサイズの有機分子をいう。この用語は、有機バイオポリマー(例えば、タンパク質、

核酸など)を除外する。好ましい小有機分子は、約5000Daまで、約2000Daまで、または約1000Daまでの範囲のサイズである。

「バイオポリマー」は、生物学的起源のポリマーをいい、例えば、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、多糖またはポリグリセリド(例えば、ジグリセリドまたはトリグリセリド)をいう。

「ポリペプチド」は、アミノ酸残基から構成されるポリマー、関連する天然に

存在する構造的改変体、およびペプチド結合で連結したその合成の非天然アナログ、関連する天然に存在する構造的改変体、およびその合成の非天然アナログをいう。合成ポリペプチドは、例えば、自動ポリペプチド合成機を用いて合成され得る。用語「タンパク質」は典型的には大きなポリペプチドをいう。用語「ペプチド」は典型的には短いポリペプチドをいう。

「ポリヌクレオチド」は、ヌクレオチド単位から構成されるポリマーをいう。ポリヌクレオチドは、天然に存在する核酸、例えば、デオキシリボ核酸(「DNA」)およびリボ核酸(「RNA」)、ならびに核酸アナログを包含する。核酸アナログは、非天然の塩基を含むアナログ、天然に存在するホスホジエステル結合以外の他のヌクレオチドとの結合に関与するヌクレオチド、またはホスホジエステル結合以外の結合を介して結合する塩基を含むものを包含する。従って、ヌクレオチドアナログは、例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、ボラノホスフェート、メチルホスホネート、キラル-メチルホスホネート、2-O-メチルリボヌクレオチド、ペプチド-核酸(PNA)などを包含するが、これらに限定されない。このようなポリペプチドは、例えば自動DNA合成機を用いて合成され得る。用語「核酸」は典型的には大きなポリヌクレオチドをいう。用語「オリゴヌクレオチド」は典型的には短いポリヌクレオチドをいい、一般的には、約50ヌクレオチドを越えない。ヌクレオチド配列がDNA配列(すなわち、A、T、G、C)によって繰り返される場合、これはまた、RNA配列(すなわち、A、U、G、C)を含み、ここで「U」が「T」を置換すると理解される。

「検出可能な部分」または「標識」は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、または化学的手段によって検出可能な組成物をいう。例えば、有用な標

識は、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、蛍光色素、電子密度試薬、酵素(例えば、ELISAで一般に使用されるようなもの)、ビオチン-ストレプトアビジン、ジオキシゲニン、ハプテン、およびタンパク質(それに対する抗血清またはモノクローナル抗体が入手可能なもの)、または標的に対して相補的な配列を有する核酸分子を包含する。検出可能な部分はしばしば、放射性シグナル、色素原性シグナル、または蛍光シグナ



ルのような測定可能なシグナルを発生し、これは試料中の結合した検出可能な部分の量の定量のために使用され得る。検出可能な部分は、プライマーまたはプローブに、共有結合的に、またはイオン結合、ファンデルワールス結合もしくは水素結合を介してのいずれかで取り込まれ得るか、あるいは付加し得る。例えば放射性ヌクレオチド、またはストレプトアビジンで認識されるビオチン化ヌクレオチドが取り込まれる。検出可能な部分は、直接的または間接的に検出され得る。間接的検出は、この検出可能な部分に第2の直接的または間接的に検出可能な部分の結合を伴う。例えば、検出可能な部分は、結合パートナーのリガンド（例えばビオチン（これはストレプトアビジンに対する結合パートナーである））、またはヌクレオチド配列（これは相補的配列の結合パートナーであり、これに対して特異的にハイブリダイズし得る）であり得る。結合パートナーはそれ自体直接的に検出可能であり得、例えば、抗体はそれ自体が蛍光分子で標識され得る。結合パートナーはまた間接的に検出可能であり、例えば、相補的ヌクレオチド配列を有する核酸は分枝DNAの一部であり得、これが次に他の標識された核酸分子とのハイブリダイゼーションによって検出可能となる。（例えば、PD, FahrlanderおよびA.Klausner、Bio/Technology(1988)6:1165を参照のこと）。シグナルの定量は、例えば、シンチレーション計数、デンストメトリー、またはフローサイトメトリーによって達成される。

「複数」は、少なくとも2つを意味する。

「精製する」または「精製」は、精製される組成物から少なくとも1つの混入物を除去することを意味する。精製は精製された化合物が100%純粋であることを必要としない。

「リガンド」は標的分子に特異的に結合する化合物である。

「レセプター」はリガンドに特異的に結合する化合物である。

「抗体」は、1つの免疫グロブリン遺伝子もしくは複数の免疫グロブリン遺伝子、またはそのフラグメントで実質的にコードされるポリペプチドをいい、これはエпитープ（例えば、抗原）を特異的に結合および認識する。認識される免疫グロブリン遺伝子は、カッパおよびラムダ軽鎖定常領域遺伝子、アルファ、ガンマ

、デルタ、イプシロンおよびミュー重鎖定常領域遺伝子、および無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。抗体は、例えば、インタクトな免疫グロブリンとして、あるいは種々のペプチダーゼでの切断によって生成する詳細に特徴づけられる多数のフラグメントとして存在する。これは、例えば、Fab'およびF(ab)'<sup>2</sup>、フラグメントを包含する。用語「抗体」は本明細書において、また、抗体全体の改変によって生成された抗体フラグメント、または新規に組換えDNA方法論を用いて新規に合成されたものも包含する。これはまた、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体およびヒト化抗体を包含する。抗体の「Fc」部分は、免疫グロブリンの重鎖部分をいい、これは1つ以上の重鎖定常領域ドメイン、CH<sub>1</sub>、CH<sub>2</sub>、およびCH<sub>3</sub>を含むが、重鎖可変領域を含まない。

リガンドまたはレセプター(例えば、抗体)は、そのリガンドまたはレセプターが、異種化合物の試料中の被分析物の存在を決定する結合反応において機能する場合に、化合物被分析物に対して「特異的に結合する」または「特異的に免疫反応性である」。従って、指定のアッセイ(例えば、イムノアッセイ)条件下で、リガンドまたはレセプターは特定の被分析物に優先的に結合し、そして試料中に存在する他の化合物の有意な量とは結合しない。例えば、ポリヌクレオチドはハイブリダイゼーション条件下で相補的配列を含む被分析物ポリヌクレオチドに特異的に結合する；抗体は、イムノアッセイ条件下で、その抗体が惹起されたエпитープを有する抗原被分析物に特異的に結合する；そして吸着体は、適切な溶離条件下で被分析物に特異的に結合する。

「物質(agent)」は、化学化合物、化学化合物の混合物、未知組成物の試料、組合せ的小分子アレイ、生物学的巨大分子、バクテリオファージペプチド提示ライブラリー、バクテリオファージ抗体(例えば、scFv)提示ライブラリー、ポリソームペプチド提示ライブラリー、あるいは細菌、植物、真菌、または動物細胞もしくは組織のような生物学的材料から作製した抽出物をいう。適切な技術は、

ファージまたは同様のベクター中の組換え抗体のライブラリーの選択を伴う。Huseら(1989)Science 246:1275-1281;およびWardら(1989)Nature 341:544-546を参照のこと。Huseによって記述されるプロトコルはファージ提示技術との組み合わせ

わせによってより効率的になる。例えばDowerら、WO 91/17271およびMcCaffertyら、WO 92/01047を参照のこと。

「組換えポリヌクレオチド」は、天然では互いに連結しない配列を有するポリヌクレオチドをいう。増幅または組み立てられた組換えポリヌクレオチドを適切なベクターに入れてもよく、そしてこのベクターを用いて適切な宿主細胞を形質転換し得る。組換えポリヌクレオチドを含む宿主細胞を「組換え宿主細胞」という。次いで、遺伝子を組換え宿主細胞中で発現させて、例えば「組換えポリペプチド」を産生する。組換えポリヌクレオチドは、また、非コーディング機能(例えば、プロモーター、複製起点、リボソーム結合部位など)として作用し得る。適切な単細胞宿主は、真核生物または哺乳類ポリヌクレオチドの発現において日常的に使用される任意の単細胞宿主を包含し、例えば、E.coliのような原核生物；および例えば酵母のような真菌を含む真核生物；および昆虫細胞(例えばSf9)および動物細胞(例えば、CHO、R1.1、B-W、L-M、アフリカミドリザル腎臓細胞(例えば、COS 1、COS 7、BSC 1、BSC 40およびBMT 10)および培養ヒト細胞)を包含する哺乳類細胞を包含する。

「発現制御配列」は、ポリヌクレオチド中のヌクレオチド配列であって、それに作動可能に連結したヌクレオチド配列の発現(転写および/または翻訳)を調節する配列をいう。「作動可能に連結した」は、2つの部分の機能的関係であって、1つの部分の活性(例えば、転写を調節する能力)の結果、他の部分が作用する(例えば、配列の転写)ものをいう。発現調節配列は、例えば、プロモーター(例えば、誘導性、抑制性、または構成的)、エンハンサー、転写ターミネーター、開始コドン(すなわちATG)、イントロンのためのスプライシングシグナル、および終止コドンの配列を包含し得るが、これらに限定されない。

「発現ベクター」は、発現されるヌクレオチド配列に作動可能に連結した発現制御配列を含む組換えポリヌクレオチドを含むベクターをいう。発現ベクターは、発現のための十分なシス作動性要素を含む；発現のための他の要素は宿主細胞

ま

たはインビトロ発現系によって補充され得る。発現ベクターは当該分野で公知の

全てのベクター、例えば、コスミド、プラスミド(例えば、裸の、あるいはリボソーム中に含まれた)および組換えポリヌクレオチドを取り込んだウイルスである。

「コードする」は、ポリヌクレオチド(例えば、遺伝子、cDNA、またはmRNA)中の特定のヌクレオチド配列が、定義されたヌクレオチドの配列(すなわち、rRNA、tRNAおよびmRNA)または定義されたアミノ酸の配列のいずれかを有し、そしてその結果得られる生物学的特性を有する他のポリマーまたは巨大分子の生物学的プロセスにおける合成のための鋳型として働く固有の特性をいう。従って、遺伝子によって産生されるmRNAの転写または翻訳によって、細胞中または他の生物学的系中でタンパク質が産生される場合、その遺伝子はタンパク質をコードする。遺伝子またはcDNAのコード鎖(そのヌクレオチド配列がmRNA配列と同一であり、そして通常、配列表として提供される)および非コード鎖(転写の鋳型として使用される)の両方が、タンパク質、あるいはその遺伝子またはcDNAの他の産物をコードすると称され得る。特に指示のない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いに縮重したバージョンであって、同じアミノ酸配列をコードする、全てのヌクレオチド配列を包含する。タンパク質およびRNAをコードするヌクレオチド配列はイントロンを含み得る。

「エネルギー吸収分子」は、脱離スペクトロメトリのエネルギー源からエネルギーを吸収して、それによりプローブ表面からの被分析物の脱離を可能とする分子をいう。MALDIで使用されるエネルギー吸収分子はしばしば「マトリクス」と称される。ケイ皮酸誘導体、シナピン酸(cinapinic acid)、およびジヒドロキシ安息香酸が、生体有機分子のレーザー脱離におけるエネルギー吸収分子としてしばしば使用される。

## II. 被保持物クロマトグラフィー

被保持物クロマトグラフィーは試料中の被分析物の多次元分離のための方法である。この方法は、(1)複数の異なる吸着体/溶離物の組み合わせ(「選択条件」)下で、試料中から被分析物を基材に選択的に吸着する工程、および(2)吸着

された被分析物の保持を脱離スペクトロメトリによって検出する工程を包含する

。各選択条件は、第1の分別の次元を提供し、吸着されない被分析物から、吸着された被分析物を分別する。脱離質量スペクトロメトリは、第2の分別の次元を提供し、吸着した被分析物を質量に従って互いに分別する。被保持物クロマトグラフィーは複数の異なる選択条件の使用を伴うので、多くの分別の次元が達成される。1つ以上の被分析物の2つの選択条件下での相対的な吸着もまた決定される。この多次元分別は被分析物の分離およびその特徴付けの両方を提供する。

さらに、このようにして分別された被分析物は被保持物マップにドッキングしたままであり、これは試験(例えば、被分析物の構造および/または機能)のためのさらなる操作をし易い。また、ドッキングした被分析物はそれ自体、基材に曝露される他の被分析物をドッキングするための吸着体として使用され得る。要約すれば、本発明は、被分析物の迅速、多次元かつ高度情報分離を提供する。

この方法はいくつかの形態をとり得る。1つの実施態様において、被分析物は2つの物理的に異なる位置で2つの異なる吸着体に吸着され、そして各吸着体は同じ溶離物(選択閾値調節物)で洗浄される。別の実施態様において、被分析物は2つの物理的に異なる位置で同一の吸着体に吸着され、そして2つの異なる溶離物で洗浄される。別の実施態様において、被分析物は物理的に異なる位置で2つの異なる吸着体に吸着され、そして2つの異なる溶離物で洗浄される。別の実施態様において、被分析物は吸着体に吸着され、そして第1の溶離物で洗浄され、そして保持が検出される。次いで、吸着された被分析物は第2の異なる溶離物で洗浄され、そして次に保持が検出される。

#### A. 被保持物クロマトグラフィーの実施方法

##### 1. 選択条件への被分析物の曝露

###### a. 基材の調製

被保持物クロマトグラフィーの実施において、吸着体に保持される被分析物は基材上でエネルギー源に対して提示される。被分析物を含む試料を、吸着体を基材(これは被分析物を脱離手段に提示するのに役立つ)に添加する前または後に、吸着体に接触させ得る。接触の目的のために、吸着体は液体形態または固体形態(すなわち基材または固相上)であり得る。詳細には、吸着体は、溶液、懸濁液、

分散液、油中水型乳濁液、水中油型乳濁液、またはマイクロ乳濁液の形態であり得る。吸着体が懸濁液、分散液、乳濁液またはマイクロ乳濁液の形態で提供される場合、適切な界面活性剤もまた存在し得る。この実施態様において、試料は、液体試料が液体吸着体と混合されることによって吸着体と接触され得る。あるいは、試料は固体支持体上に提供され得、そして接触は、試料を含む固体支持体を液体吸着体中に浸漬(bathing)、ソーキング、またはディップリングすることによって達成される。さらに、試料は、固体支持体に液体吸着体を吹き付けるか、または固体支持体を液体吸着体で洗うことによって接触され得る。この実施態様において、異なる吸着体は異なる容器中に提供され得る。

1つの実施態様において、吸着体は基材上に提供される。基材は吸着体を結合または保持し得る任意の材料であり得る。代表的には、基材は、ガラス；セラミック；電気伝導性ポリマー(例えば、炭素化PEEK)；TEFLON®コート材料；有機ポ

リマー；天然バイオポリマー；金属(例えば、ニッケル、真鍮、鋼またはアルミニウム)；フィルム；多孔質および非多孔質の架橋ポリマーのビーズ(例えば、アガロース、セルロースまたはデキストラン)；他の不溶性ポリマー；またはそれらの組み合わせから構成される。

1つの実施態様において、基材は、脱離検出器に挿入されるプローブまたは試料提示手段の形態をとる。例えば、図1を参照すると、基材はストリップの形態でとり得る。吸着体は基材にスポットの線状アレイの形態で付着され得、これらの各々が被分析物に曝露され得る。いくつかのストリップが互いに連結され、その結果複数の吸着体が定義された列に不連続のスポットを有するアレイ30を形成し得る。基材はまた、吸着体の水平および垂直の列のアレイを有するプレート

の形態であり得、これは正方形、長方形または円のような規則的な幾何学的パターンを形成する。

プローブは以下のように作製され得る。基材は任意の固体材料、例えば、ステンレス鋼、アルミニウムまたはケイ素ウエハであり得る。次いで、金属基材は表面が誘導体化され得る材料でコートされ得る。例えば、金属表面は酸化ケイ素、酸化チタンまたは金でコートされ得る。

次に表面を二官能性リンカーで誘導体化する。リンカーは1つの端に、表面上

の官能基と共有結合し得る官能基を含む。従って、官能基は無機酸化物または金のためにはスルフィド基であり得る。リンカーの他の端は一般にアミノ官能基を有する。有用な二官能性リンカーとしては、アミノプロピルトリエトキシシランまたはアミノエチルジスルフィドが挙げられる。

一旦表面に結合したら、リンカーは吸着体として作用する基でさらに誘導体化される。一般に、吸着体はプローブ上のアドレス可能な位置に付加される。1つのプローブの型では、直径約3mmのスポットが直交アレイで配置される。吸着体はそれ自体が、利用可能なアミノ基と反応する基および吸着体として作用する官能基を含む二官能性分子の一部であり得る。官能基は、例えば、順相(酸化ケイ素)、逆相(C<sub>18</sub>脂肪族炭化水素)、第四級アミンおよびスルホネートを包含する。また、表面はさらにカルボジイミドおよびN-ヒドロキシスクシンイミドのような他の二官能性分子で誘導体化され得、予備活性化ブランクを作製する。これらのブランクは生体有機吸着体(例えば、核酸、抗体および他のタンパク質リガンド)で官能化され得る。バイオポリマーが、アミン残基またはスルフィド残基を通じてブランク上の官能基に結合し得る。1つの実施態様において、吸着体は架橋ポリマー(例えばフィルム)に結合し、架橋ポリマーはそれ自体は、利用可能な官能基を通じてプローブの表面に結合する。このようなポリマーは、例えば、セルロース、デキストラン、カルボキシメチルデキストラン、ポリアクリルアミドおよびこれらの混合物を包含する。付着した吸着体を有するプローブは使用の準備ができています。

別の実施態様において、吸着体を第1の基材に付着させて固相(例えば、ポリマーまたはガラスのビーズ)を提供し、これを次に第2の基材上に配置し、第2の基材は、脱離検出器の脱離エネルギーに試料を提示する手段として働く。例えば、第2の基材は、所定のアドレス可能な位置に一連のウェルを有するプレートの形状であり得る。ウェルは吸着体で誘導体化された第1の基材(例えば、吸着体で誘導体化されたポリマー性ビーズ)のための容器として働き得る。この実施態様の1つの利点は、被分析物が第1の基材に1つの物理的状況で吸着され得、そして脱離

スペクトロメトリによる分析のために試料を提示する基材に移され得ることである。

代表的には、基材は、吸着体に結合しそして保持された被分析物を検出するために本発明の方法で使用される検出器での使用に適合する。1つの実施態様において、基材は脱離検出器中に取り外し可能に挿入され得、脱離検出器中でエネルギー源がスポットに当たり、そして被分析物を脱離させ得る。基材は水平および/または垂直に移動できるキャリッジへの装着に適切であり得、このキャリッジが水平および/または垂直に基材を動かし、エネルギー源の呼びかけおよびそこに結合した被分析物の検出のためのバス中の吸着体の各所定のアドレス可能な位置に連続的に配置する。基材は従来の質量スペクトロメトリプローブの形状であり得る。

基材のストリップ、プレート、またはプローブは従来の技術を用いて作製され得る。その後、被分析物を含む試料と接触させる前に、吸着体を基材上に直接的または間接的にカップリング、取り付け、または堆積し得る。吸着体を、付着または固定化に適切な任意な手段により、基材上に直接的または間接的にカップリングし得る。例えば、吸着体は、基材を吸着体で誘導体化して、吸着体が共有結合または非共有結合を通じて基材に直接結合するようにすることによって、基材と直接カップリングし得る。

吸着体の基材への付着は、種々の機構を通じて達成され得る。基材は、予め調製された吸着体分子を基材に付着することによって、完全に調製された吸着体分子で誘導体化され得る。あるいは、吸着体は、前駆体分子を基材に付着させ、そして次に第1の前駆体分子によって基材に結合した成長中の鎖にさらなる前駆体分子を付加することによって、基材上に形成され得る。基材上に吸着体を構築するこの機構は、吸着体がポリマー、特にDNAまたはRNA分子のようなバイオポリマーである場合、特に有用である。バイオポリマー吸着体は、オリゴヌクレオチドチップ技術の分野で公知の方法を用いて、基材に付着した最初の塩基に連続的に塩基を付加することによって提供され得る。例えば、米国特許第5,445,934号(Fodorら)を参照のこと。



図2に示され得るように、2個程度の少ない吸着体、および10、100、1000、10、000個以上の程度の多くの吸着体が単一の基材にカップリングされ得る。吸着体部位のサイズは、実験設計および目的に応じて変化し得る。しかし、衝突エネルギー

源の直径(例えば、レーザースポット直径)より大きい必要はない。スポットは同じまたは異なる吸着体に続き得る。いくつかの場合においては、同じ吸着体を基材上の複数の位置に提供して、複数の異なる溶離物に対する評価を可能にするか、あるいはその結果、結合した被分析物を将来の使用、またはおそらく二次処理における参照のために保存し得ることが有利である。複数の異なる吸着体を有する基材を提供することによって、単一の試料に関して異なる吸着体の組み合わせによって提供される複数の結合特性を利用し、そしてそれによって、より広範囲の異なる被分析物を結合し、かつ検出することが可能である。単一の試料の評価のために基材上の複数の異なる吸着体を使用することは、各々異なるクロマトグラフィーカラムを用いる複数のクロマトグラフィー実験を同時に行うことと本質的に等価であるが、本発明はただ一つの系のみが必要とされるという利点を有する。

基材が複数の吸着体を含む場合、吸着体を所定のアドレス可能な位置に提供することが特に有用である。所定のアドレス可能な位置に吸着体を提供することによって、第1の所定のアドレス可能な位置の吸着体を第1の溶離物で洗浄し、そして第2の所定のアドレス可能な位置の吸着体を第2の溶離物で洗浄することが可能となる。この様式において、被分析物に対する単一の吸着体の結合特性を複数の溶離物の存在下で評価することができる。複数の溶離物の各々は吸着体の結合特性を異なる仕方を選択的に改変する。アドレス可能な位置は任意のパターンに配列され得るが、好ましくは、規則的なパターン、例えば、線、直交アレイ、または円のような規則的な曲線で配置される。同様に、基材が複数の異なる吸着体を含む場合、溶離物の存在下で所定の吸着体の結合特性を評価するために、異なる各吸着体に関して単一の溶離物を評価することが可能である。異なる溶離物の存在下で異なる吸着体の結合特性を評価することもまた可能である。

(1)増分または勾配の吸着体表面

異なる結合特性を有する一連の吸着体は、基材上に複数の異なるポリマー吸着体を合成することによって提供され得る。異なるポリマー吸着体は、前駆体分子を基材に付着し、重合反応を開始し、そして各吸着体について異なる完了程度で重合反応を停止することによって提供され得る。また、ポリマーの末端官能基は、

異なる親和性試薬(例えば、 $-NH_2$ 、または $COO^-$ )で異なる程度までこれらを化学的に誘導体化するように反応され得る。重合または誘導体化反応を停止することによって、異なる重合度または誘導体化度の吸着体が生成される。異なる重合度または誘導体化度は異なる各ポリマー吸着体について異なる結合特性を提供する。この実施態様は、複数の異なるバイオポリマー吸着体を基材上に提供するために特に有用である。

所望であれば、重合反応は基材自体の上ではなく反応容器中で行われ得る。例えば、異なる結合特性のポリマー吸着体が、重合/誘導体化反応が進行するにつれ反応容器から生成物のアリコートを描出することによって提供され得る。重合/誘導体化反応の間の種々の時点で描出されたアリコートは、種々の重合/誘導体化の程度を示し、複数の異なる吸着体を生じる。次に、生成物の異なるアリコートを、異なる結合特性を有する吸着体として利用し得る。あるいは、反応の停止工程、生成物のアリコートを抜き取る工程、および重合/誘導体化反応を再度開始する工程を連続的に繰り返すことによって、複数の異なる吸着体を提供し得る。各停止時点で描出された生成物は異なる程度の重合/誘導体化を示し、そしてその結果、異なる結合特性を有する複数の吸着体が提供される。

1つの実施態様において、基材はストリップまたはプレートの形状で提供され、基材は1つ以上の結合特性が一次元または二次元の勾配で変化した吸着体でコートされる。例えば、一端では疎水性が弱い、他の一端では疎水性が強い吸着体を有するストリップが提供される。あるいは、1つの角では疎水性およびアニオン性が弱く、そして対角線上に対向する角では疎水性およびアニオン性が強いプレートが提供される。このような吸着勾配は、被分析物の定量分析に有用である。吸着勾配は、制御された吹き付け塗布によって、あるいは材料を、時間の経過

につれて勾配の次元に対する反応の完了の漸増を可能にするような様式で表面に流すことによって作製され得る。このプロセスを正しい角度で繰り返して、異なる結合特性を有する同じまたは異なる吸着体の直交勾配を提供し得る。

被分析物を含む試料を、吸着体を基材上に配置する前または後のどちらかに、被分析物と吸着体との間の結合を可能とする任意の適切な方法を用いて吸着体と接触させ得る。吸着体は試料と単に混台または台わされ得る。試料は、基材を試

料中に浸漬もしくはソーキングすることにより、または基材を試料中にディッピングすることにより、または試料を基材上に吹き付けることにより、試料を基材上で洗浄することにより、または試料もしくは被分析物を吸着体と接触させることによって、吸着体と接触し得る。さらに、試料は、試料を溶離物中に溶解するか、あるいは試料を溶離物と混合し、そしてこの溶離物および試料の溶液を任意の上記の技術(すなわち、浸漬、ソーキング、ディッピング、吹き付け、または洗浄)を用いて吸着体と接触させることによって、吸着体と接触し得る。

#### b. 被分析物と吸着体との接触

被分析物を吸着体と結合させる前に試料を溶離物に曝露することは、吸着体の選択性を改変し、同時に試料を吸着体に接触させる効果を有する。吸着体に結合し、それにより保持される試料の成分は、吸着体の選択性を改変する溶離特性の非存在下で吸着体に結台する全ての成分ではなく、むしろ試料と合わされた特定の溶離物の存在下で吸着体に結合する成分のみを含む。

試料は、被分析物を吸着体に結合させるに十分な時間、吸着体に接触させるべきである。代表的には、試料を、約30秒から約12時間の間、吸着体に接触させる。好ましくは、試料を、約30秒から約15分間の間、吸着体に接触させる。

試料を吸着体に接触させる温度は、特定の試料および選択される吸着体の関数である。代表的には、試料を周囲の温度および圧力条件下で吸着体と接触させるが、いくつかの試料については、改変された温度(代表的には4℃から37℃)および圧力条件が所望され得、そしてこれは当業者によって容易に決定され得る。

従来の検出技術に対する本発明の別の利点は、本発明が数多くの異なる実験を非常に少量の試料で行うことを可能とすることである。一般に、吸着体の結合の

ためには、 $1\mu\text{l}$ から $500\mu\text{l}$ 中に数原子モルから100ピコモルの被分析物を含む容量の試料で十分である。被分析物は、吸着体に結合させた後、将来の実験のために保存され得る。なぜなら保持された被分析物の全ての脱離工程および検出工程に供されなかった任意の吸着体位置は、その上に被分析物を保持するからである。従って、試料の非常に少量しか分析のために利用できない場合、本発明は、試料を無駄にすることなく、異なる回数で行われる異なる吸着体および/または溶離物を用いる多数の実験を可能とするという利点を提供する。

### C・溶離物による吸着体の洗浄

試料を被分析物と接触させて、その結果、被分析物が吸着体に結合した後、吸着体を溶離物で洗浄する。代表的には、多次元分析を提供するために、各吸着体位置を少なくとも第1および第2の異なる溶離物で洗浄する。溶離物による洗浄は、特定された吸着体上に保持された被分析物の集団を改変する。吸着体の結合特性と溶離物の溶離特性との組み合わせが、洗浄後に吸着体によって保持される被分析物を制御する選択条件を提供する。したがって、洗浄工程は吸着体から試料成分を選択的に除去する。

洗浄工程は種々の技術を用いて行われ得る。例えば、上述のように、試料を吸着体に接触させる前に、試料を第1の溶離物中に溶解するか、あるいは試料を第1の溶離物と混合し得る。試料を吸着体に接触させる前またはそれと同時に、試料を第1の溶離物に曝露することは、被分析物を吸着体と結合させ、そして次に吸着体を第1の溶離物で洗浄することと同じ正味の効果を一次近似の程度まで有する。合わせた溶液を吸着体に接触させた後、吸着体を第2のまたは次の溶離物で洗浄し得る。

結合した被分析物を有する吸着体の洗浄は、吸着体およびその上に結合した被分析物を有する基材を溶離物中に浸漬、ソーキング、またはディッピングすることによって達成され得る。または基材を溶離物でリンスし、基材に溶離物を吹き付け、もしくは溶離物で洗浄することによって達成され得る。親和性試薬の直径の小なスポットに溶離物を導入することは、マイクロ流体工学(microfluidics)プロセスによって最もよく達成される。

被分析物が吸着体にただ1つの位置で結合し、そして複数の異なる溶離物が洗浄工程で用いられる場合、各溶離物の存在下での吸着体の選択性に関する情報が独立して得られ得る。1つの位置で吸着体に結合した被分析物は、溶離物による各洗浄の後、第1の溶離物による洗浄、保持された被分析物の脱離および検出、次いで第2の溶離物による洗浄、および保持された被分析物の脱離および検出の繰り返しパターンに従って決定され得る。洗浄とその後の脱離および検出の工程は、同じ吸着体を用いて複数の異なる溶離物について連続的に繰り返され得る。この様式において、単一の位置に保持された被分析物を有する吸着体は、複数の

異なる溶離物で再試験されて、個々の各洗浄の後に保持された被分析物に関する一群の情報が提供され得る。

上記の方法はまた、吸着体が複数の所定のアドレス可能な位置に提供される場合(吸着体が全て同一の場合、または異なる場合のいずれでも)にも有用である。しかし、被分析物が複数の位置の同じまたは異なる吸着体のいずれかに結合する場合、洗浄工程は、代わりに、より平行処理を伴う系統的かつ効率的なアプローチを用いて行われ得る。すなわち、洗浄工程は、第1の位置で溶離物で吸着体を洗浄し、次に第2の吸着体を溶離物で洗浄し、次に第1の吸着体に保持された被分析物を脱離および検出し、そしてその後第2の吸着体で保持された被分析物を脱離および検出することによって行われ得る。換言すれば、全ての吸着体を溶離物で洗浄し、そしてその後、各々によって保持された被分析物を吸着体の各々の位置について脱離および検出する。所望であれば、各吸着体位置での検出の後、各吸着体位置について第2の洗浄段階を実行し得、次いで第2の脱離および検出段階を実行し得る。全ての吸着体位置の洗浄、次いで各吸着体位置での脱離および検出の工程が、複数の異なる溶離物について繰り返され得る。この様式で、アレイ全体が試料中の被分析物の性質の効率的な決定のために利用され得る。この方法は、全ての吸着体位置を第1の洗浄段階で同じ溶離物で洗浄する場合でも、あるいは複数の吸着体を第1の洗浄段階で複数の異なる溶離物で洗浄する場合でも、有用である。

## 2. 検出

洗浄後吸着体により保持される被分析物は、基材に吸着される。基材上に保持される被分析物は、以下の脱離スペクトロメトリにより検出される：吸着体から被分析物を脱離する工程および脱離した被分析物を直接検出する工程。

#### a. 脱離のための方法

吸着体からの被分析物の脱離は、被分析物を適切なエネルギー源に曝露することに伴う。通常、このことは、被分析物に放射エネルギーまたはエネルギー粒子を衝突させることを意味する。例えば、エネルギーはレーザーエネルギー（例えばUVレーザー）またはフラッシュランプからのエネルギーの形態の光エネルギーであり得る。あるいは、エネルギーは高速原子の流れであり得る。熱もまた、脱

離の誘導／補助のために使用され得る。

直接分析のために被分析物を脱離および／または電離する方法が当該分野で周知である。このような方法の1つはマトリクス補助(matrix-assisted)レーザー脱離／電離、すなわちMALDIと呼ばれる。MALDIでは、被分析物溶液をマトリクス溶液と混合し、そして混合物を不活性プローブ表面上に堆積させた後に結晶化させ、被分析物を結晶中にトラップすることで脱離が可能となり得る。マトリクスは、レーザーエネルギーを吸収し、そしてそのエネルギーを被分析物に明らかに与え、その結果脱離および電離が生じるように選択される。一般に、マトリクスはUV範囲で吸収する。大きいタンパク質のためのMALDIは、例えば、米国特許第5,118,937号(Hillenkampら)および米国特許第5,045,694号(BeavisおよびChait)に記載される。

表面増強(surface-enhanced)レーザー脱離／電離(すなわちSELDI)は、特異性、選択性および感度の点で、MALDIに対して顕著な進歩を示す。SELDIは米国特許第5,719,060号(HutchensおよびYip)に記載される。SELDIは脱離のための固相法であり、ここで被分析物は表面上でエネルギー流に対して提示され、これが被分析物の捕捉および／または脱離を増強する。対照的に、MALDIは液相法であり、ここで被分析物は液体材料と混合され、この液体材料が被分析物の周囲に結晶化する。

SEAC(表面増強親和性捕捉)と呼ばれるSELDIの1つのバージョンは、被分析物を

親和性捕捉装置(すなわち吸着体)とともに脱離エネルギーに対して提示すること  
を伴う。被分析物がそのように吸着される場合、被分析物は、脱離エネルギー源  
に対して、標的被分析物の脱離を達成する機会がより増すように提示され得るこ  
とが見いだされた。エネルギーを吸収する材料が、プローブに付加されて脱離を  
補助し得る。次にプローブを、被分析物を脱離するためのエネルギー源に対して  
提示する。

SEND(表面増強ニート脱離)と呼ばれるSELDIの別のバージョンは、被分析物が  
その上に配置されるエネルギー吸収材料の層の使用を伴う。基材表面は、その表  
面に化学的に結合し、そして/あるいは本質的に結晶を含まないエネルギー吸収  
分子の層を含む。次に被分析物を単独(すなわちニート)で層の表面に付与し、実

質的にこれと混合しない。エネルギー吸収分子は、マトリクスのように脱離エネ  
ルギーを吸収し、そして被分析物の脱離が引き起こされる。この改良は、実質的  
なものである。なぜなら、被分析物がここでエネルギー源に対してより単純かつ  
より均一な様式で提示され得るからである。なぜなら、溶液混合物の性能および  
ランダムな結晶化が除外されるからである。これにより、より均一かつ予想可能  
な結果が提供され、これによりプロセスの自動化が可能となる。エネルギー吸収  
材料は古典的なマトリクス材料であり得るか、またはそのpHが中和されたかもし  
くは塩基性範囲にされたマトリクス材料であり得る。エネルギー吸収分子は、共  
有結合的または非共有結合的手段を通じてプローブに結合し得る。

SEPAR(表面増強感光性結合および放出)と呼ばれるSELDIの別のバージョンは感  
光性結合分子の使用を伴う。感光性結合分子は、固相(例えば、平板なプローブ  
表面またはプローブの一部を構成し得る別の固相(例えばビーズ))に共有結合す  
る1つの部位、および親和性試薬または被分析物に共有結合し得る第2の部位を有  
する二価分子である。感光性結合分子は、表面および被分析物の両方に結合する  
場合、光に曝露したときに親和性試薬または被分析物を放出し得る感光性結合も  
含む。感光性結合は、結合分子内にあり得るか、または被分析物(または親和性  
試薬)もしくはプローブ表面のいずれかに対する結合部位にあり得る。

#### b. 被分析物の直接検出のための方法

脱離した被分析物は、任意のいくつかの手段で検出され得る。被分析物が脱離プロセス(例えばレーザー脱離/電離質量スペクトロメトリ)で電離される場合、検出器はイオン検出器であり得る。質量スペクトロメトリは、一般に、脱離イオンの飛行時間を決定する手段を含む。この情報は質量に変換される。しかし、脱離イオンを分離および検出するために脱離イオンの質量を決定する必要はない。電離した被分析物が検出器に異なる時間で衝突する事実により、それらの検出および分離が提供される。

あるいは、被分析物は、例えば、蛍光部分または放射性部分で検出可能に標識され得る。これらの場合、検出器は蛍光検出器または放射能検出器であり得る。

複数の検出手段を連続して実行して、被分析物成分および被保持物に関連する機能をアレイの各位置で十分に呼びかけし得る。

### C. 脱離検出器

脱離検出器は、被分析物を吸着体から脱離するための手段、および脱離した被分析物を直接検出する手段を含む。すなわち、脱離検出器は、別の固相中に被分析物を捕捉する中間工程およびそれを次の分析に供する工程を伴わずに、脱離した被分析物を検出する。被分析物の検出は通常、シグナル強度の検出を伴う。これは、次には、吸着体に吸着した被分析物の量を反映する。

これらの2つの要素の他に、脱離検出器は他の要素もまた有し得る。このような要素の1つは、脱離した被分析物を検出器に向かって加速する手段である。別の要素は、脱離から検出器による検出までの被分析物の飛行時間を決定するための手段である。

好ましい脱離検出器はレーザー脱離/電離質量スペクトロメーターであり、これは当該分野で周知である。質量スペクトロメーターは、吸着した被分析物を運ぶ基材(例えば、プローブ)を挿入するポートを含む。脱離は、被分析物にレーザーエネルギーのようなエネルギーを衝突させることによって達成される。装置は、アレイ上の任意のスロットがレーザービームのライン中に運ばれるように、表面を移動する手段を含み得る。被分析物にレーザーを当てると、その結果、無傷の被分析物が飛行管中に脱離し、そして電離する。飛行管は一般に真空スペー



スを規定する。真空中の一部にある帯電したプレートが電位を形成し、これが電離した被分析物を検出器に向けて加速する。時計により飛行時間を測定し、そして系のエレクトロニクスにより被分析物の速度を決定し、そしてこれを質量に変換する。当業者が理解するように、任意のこれらの要素が、脱離、加速、検出、時間測定などの種々の手段を使用する脱離検出器のアセンブリ中で、本明細書に記載される他の要素と組み合わせられ得る。

## B. 選択条件

本発明の1つの利点は、被分析物の上昇した分離および認識プロファイルの形態での被分析物についての情報の両方を提供する、種々の異なる結合および溶離条件に被分析物を曝露する能力である。従来のクロマトグラフ方法におけるように、吸着体が被分析物を保持する能力は、溶離物に対する被分析物のまたは吸着

体に対する溶離物の引力または親和性と比較した、吸着体に対する被分析物の引力または親和性に直接関連する。試料のいくつかの成分は吸着体への親和性を有し得ず、したがって試料が吸着体に接触する場合に吸着体に結合しない。吸着体に結合することが不可能であるため、これらの成分は、分離されるべき被分析物からすぐに分別される。しかし、試料および利用される特定の吸着体の性質に依存して、多くの異なる成分は、最初に吸着体に結合し得る。

### 1. 吸着体

吸着体は、被分析物を結合する物質である。多数の吸着体は、被保持物クロマトグラフィーに用いられ得る。異なる吸着体は、大きく異なる結合特性、幾分異なる結合特性、または微妙に異なる結合特性を示し得る。大きく異なる結合特性を示す吸着体は、代表的には、引力の基礎または相互作用の態様が異なる。引力の基礎は、一般的に、化学的または生物学的分子認識の機能である。吸着体と被分析物との間の引力についての基礎は、例えば、(1)塩促進された相互作用、例えば、疎水性相互作用、親硫黄性相互作用、および固定された染料相互作用；(2)水素結合および／またはファンデルワールス力相互作用、および電荷移動相互作用、例えば、親水性相互作用の場合；(3)静電相互作用、例えば、イオン電荷相互作用、特に陽または陰イオン電荷相互作用；(4)被分析物が吸着体の金属イ

オンと配位共有結合（すなわち、配位複合体形成）を形成する能力；(5)酵素活性部位結合；(6)可逆的の共有相互作用、例えば、ジスルフィド交換相互作用；(7)糖タンパク質相互作用；(8)生物特異的の相互作用；または(9)相互作用の上記の態様の2つ以上の組み合わせ、を含む。すなわち、吸着体は、吸着力の2つ以上の基礎を示し得、したがって「混合機能性」吸着体として公知である。

#### a. 塩促進された相互作用吸着体

塩促進された相互作用を観察するために有用である吸着体には、疎水性相互作用吸着体を含む。疎水性相互作用吸着体の例には、脂肪族炭化水素、特に $C_6-C_{10}$ 脂肪族炭化水素を有するマトリクス；およびフェニル基のような芳香族炭化水素官能基を有するマトリクスが含まれる。疎水性相互作用吸着体は、非荷電溶媒

に曝露されたアミノ酸残基、そして詳細には、フェニルアラニンおよびトリプトファンのような非極性、芳香族、および疎水性アミノ酸残基と普通呼ばれるアミノ酸残基を含む、被分析物を結合する。疎水性相互作用吸着体に結合する被分析物の特定の例には、リポチームおよびDNAが挙げられる。特定の理論により拘束されることは望まないが、DNAが、DNA中の芳香族ヌクレオチド、詳細にはプリンおよびピリミジン基によって、疎水性相互作用吸着体に結合すると考えられる。

塩促進された相互作用を観察するために有用な他の吸着体には、例えば、Pierce, Rockford, Illinoisから市販される親硫黄性吸着体の1つの型であるT-GEL®

のような、親硫黄相互作用吸着体が挙げられる。親硫黄相互作用吸着体は、例えば、IgGのような免疫グロブリンを結合する。IgGとT-GEL®との間の相互作用のメカニズムは、完全には知られていないが、溶媒に曝露されたtrp残基は、役割を果たすと思われる。

塩促進されたイオン相互作用および疎水性相互作用にも関連する第3の吸着体は、固定された染料相互作用吸着体を含む。固定された染料相互作用吸着体には、例えば、Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jerseyから入手可能な、例えば、CIBACHRON®ブルーのような固定された染料のマトリクスが挙げられる。固定された染料相互作用吸着体は、一般的に、タンパク質およびDNAを結合する。固定された染料相互作用吸着体に結合するタンパク質の1つの特定の例は、ウシ

血清アルブミン (BSA) である。

#### b. 親水性相互作用吸着体

親水性相互作用に基づく水素結合および／またはファンデルワールス力を観察するために有用である吸着体は、ケイ素酸化物 (すなわち、ガラス) のような順相吸着体を含む表面を含む。順相またはケイ素酸化物表面は、官能基として作用する。さらに、ポリエチレングリコール、デキストラン、アガロース、またはセルロースのような親水性ポリマーで改変された表面を含む吸着体はまた、親水性相互作用吸着体として機能し得る。ほとんどのタンパク質は、水素結合またはファンデルワールス力を含む親水性相互作用によって結合するアミノ酸残基 (すなわち、親水性アミノ酸残基) の基または組み合わせのため、親水性相互作用吸着

体を結合する。親水性相互作用吸着体を結合するタンパク質の例には、ミオグロビン、インスリン、およびシトクロムCが挙げられる。

一般的に、高い比率の極性または荷電アミノ酸を有するタンパク質は、親水性表面に保持される。あるいは、表面に曝露された親水性糖部分を有する糖タンパク質はまた、親水性吸着体に高い親和性を有する。

#### c. 静電相互作用吸着体

静電またはイオン電荷相互作用を観察するために有用である吸着体には、例えば、硫酸アニオン (すなわち、 $\text{SO}_3^-$ ) のマトリクス、およびカルボン酸アニオン (すなわち、 $\text{COO}^-$ ) またはリン酸アニオン ( $\text{PO}_3^-$ ) のマトリクスのようなアニオン性吸着体が挙げられる。硫酸アニオンを有するマトリクスは、永続して負に荷電する。しかし、カルボン酸アニオンを有するマトリクスは、その $\text{pK}_a$ より高い $\text{pH}$ でのみ負電荷を有する。 $\text{pK}_a$ 以下の $\text{pH}$ では、マトリクスは、実質的に中性の電荷を示す。適切なアニオン性吸着体はまた、硫酸およびカルボン酸アニオンならびにリン酸アニオンの組み合わせを有するマトリクスであるアニオン性吸着体を含む。組み合わせは、 $\text{pH}$ の機能として連続して変化し得る負電荷の強度を提供する。これらの吸着体は、例えば、リボヌクレアーゼおよびラクトフェリンのような正電荷を有するタンパク質および巨大分子を誘引および結合する。特定の理論に拘束されることは望まないが、吸着体と正荷電アミノ酸残基 (リジン残基、

アルギニン残基、およびヒスチジル残基を含む) との間の静電相互作用は、結合相互作用を担うと考えられる。

静電またはイオン電荷相互作用を観察するために有用である他の吸着体には、カチオン性吸着体が含まれる。カチオン性吸着体の特定の例には、二級、三級、または四級アミンのマトリクスが含まれる。四級アミンは、永続して正に荷電する。しかし、二級および三級アミンは、 $\text{pH}$ 依存性である電荷を有する。 $\text{pK}_a$ 以下の $\text{pH}$ では、二級および三級アミンは、正に荷電し、そしてその $\text{pK}_a$ 以上の $\text{pH}$ では、負に荷電する。適切なカチオン性吸着体はまた、異なる二級、三級、および四級アミンの組み合わせを有するマトリクスであるカチオン性吸着体を含む。組み合わせは、 $\text{pH}$ の機能として連続して変化し得る正電荷の強度を提供する。カチオン

性相互作用吸着体は、アスパラギン酸およびグルタミン酸残基のような、溶媒に曝露されたアミノ酸残基を有するタンパク質を含む分子上の、アニオン性部位を結合する。

イオン相互作用吸着体 (アニオン性およびカチオン性の両方) の場合、アニオンおよびカチオンの両方を含む混合態様イオン性吸着体を使用することが、しばしば所望される。このような吸着体は、 $\text{pH}$ の機能として連続緩衝化能力を提供する。連続緩衝化能力は、特に2~11の $\text{pH}$ 範囲で異なる緩衝化成分を有する溶離物への、被分析物の組み合わせの曝露を可能にする。これによって、固定された滴定可能なプロトン交換基によって定義される吸着体の局所的 $\text{pH}$ 環境を生成する。このようなシステムは、クロマトフォーカシングとして公知の固相分別技術と等価である。濾胞刺激ホルモンイソ形態は、主に荷電した炭水化物成分で異なり、これは、クロマトフォーカシング吸着体で分別される。

静電相互作用を観察するために有用であるさらに他の吸着体には、相互作用が静電的であるが、形式電荷または滴定可能タンパク質ドナーまたはアクセプターが関与しない、双極子-双極子相互作用吸着体が挙げられる。

#### d. 配位共有相互作用吸着体

金属イオンと配位共有結合を形成する能力を観察するために有用である吸着体

には、例えば、二価および三価金属イオンを有するマトリクスが挙げられる。固定された金属イオンキレーターのマトリクスは、遷移金属イオンとの配位共有結合相互作用の基礎を形成する1つ以上の電子ドナー基を有する固定された合成有機分子を提供する。固定された金属イオンキレーターとして機能する一次電子ドナー基には、酸素、窒素、および硫黄が挙げられる。金属イオンは、被分析物の電子ドナー基との相互作用のためのいくつかの数の残存する部位を有する金属イオン複合体を生じる固定された金属イオンキレーターに結合される。適切な金属イオンには、一般的に、銅、ニッケル、コバルト、亜鉛、鉄のような遷移金属イオン、ならびにアルミニウムおよびカルシウムのような他の金属イオンが挙げられる。何らかの特定の理論に拘束されることは望まないが、金属イオンは、ペプチド、タンパク質、または核酸において特定のアミノ酸残基と選択的に相互作用

すると考えられる。代表的には、このような相互作用に関与するアミノ酸残基には、ヒスチジン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、システイン残基、ならびにアスパラギン酸およびグルタミン酸のような酸素基を有するアミノ酸残基が挙げられる。例えば、固定された三価鉄イオンは、タンパク質上のホスホセリン、ホスホチロシン、およびホスホトレオニン残基と相互作用する。固定された金属イオンに依存して、上記のアミノ酸残基の十分な局所密度を有するそれらのタンパク質のみが、吸着体によって保持される。金属イオンとタンパク質との間のいくつかの相互作用は、非常に強いので、タンパク質は従来の手段によって複合体から切断され得ない。高度にリン酸化されるヒト $\beta$ カゼインは、固定されたFe(III)に非常に強く結合する。6-ヒスチジンタグと発現される組換えタンパク質は、固定されたCu(II)およびNi(II)に非常に強く結合する。

#### e. 酵素活性部位相互作用吸着体

酵素活性部位結合相互作用を観察するために有用である吸着体には、プロテアーゼ（例えば、トリプシン）、ホスファターゼ、キナーゼ、およびヌクレアーゼが挙げられる。相互作用は、被分析物（代表的には、バイオポリマー）の酵素結合部位と酵素の触媒結合部位との配列特異的相互作用である。この型の酵素結合部位には、例えば、配列にリジン-リジンまたはリジン-アルギニン対を有するタ

ンパク質およびペプチドと相互作用するトリプシンの活性部位が含まれる。より詳細には、大豆トリプシンインヒビターは、固定されたトリプシンの吸着体と相互作用しそして結合する。あるいは、セリンプロテアーゼは、固定されたL-アルギニン吸着体に選択的に保持される。

#### f. 可逆的の共有相互作用吸着体

可逆的の共有相互作用を観察するために有用である吸着体には、ジスルフィド交換相互作用吸着体が含まれる。ジスルフィド交換相互作用吸着体には、固定されたスルフィドリル基、例えば、メルカプトエタノールまたは固定されたジチオトレイトールを含む吸着体が含まれる。相互作用は、吸着体と被分析物上の溶媒に曝露されたシステイン残基との間の共有ジスルフィド結合の形成に基づく。この

ような吸着体は、システイン残基、および還元された硫黄化合物を含むように改変された塩基を含む核酸を有するタンパク質またはペプチドを結合する。

#### g. 糖タンパク質相互作用吸着体

糖タンパク質相互作用を観察するために有用である吸着体には、そこに固定したレクチン（すなわち、オリゴ糖を有するタンパク質）を有する吸着体のような糖タンパク質相互作用吸着体が含まれ、その例は、Pharmacia Biotech of Piscataway, New Jerseyから市販される CONCONAVALIN<sup>®</sup> である。このような吸着体は、巨大分子の炭水化物部分の分子認識に関連する相互作用に基づいて機能する。糖タンパク質相互作用吸着体と相互作用しそして結合する被分析物の例には、糖タンパク質、特にヒスチジンリッチ糖タンパク質、全細胞および単離された細胞下画分が挙げられる。

#### h. 生物特異的相互作用吸着体

生物特異的相互作用を観察するために有用である吸着体は、一般的に「生物特異的親和性吸着体」と呼ばれる。吸着は、選択的でありそして親和性（平衡解離定数、Kd）が少なくとも  $10^{-3}$  M（例えば、 $10^{-5}$  M、 $10^{-7}$  M、 $10^{-9}$  M）であるならば、生物特異的と考えられる。生物特異的親和性吸着体の例には、特定の生体分子と特異的に相互作用しそして結合する任意の吸着体が挙げられる。生物特異的親和性吸着体には、例えば、抗原に結合する固定された抗体；DNA結合タンパク質、D

NA、およびRNAに結合する固定されたDNA；タンパク質および酵素に結合する固定された基質またはインヒビター；薬物結合タンパク質に結合する固定された薬物；レセプターに結合する固定されたリガンド；リガンドに結合する固定されたレセプター；DNAおよびRNA結合タンパク質に結合する固定されたRNA；ビオチンおよびビオチン化分子を結合する固定されたアビジンまたはストレプトアビジン；脂質結合タンパク質を結合する固定されたリン脂質メンブランおよびベシクルが挙げられる。酵素は、そこへの被分析物吸着体を改変し得る有用な吸着体である。細胞は、吸着体として有用である。その表面は、複合結合特性を提示する。細胞への吸着は、例えば、表面レセプターに結合するリガンドまたはシグナル分

子を同定するために有用である。ウイルスまたはファージも、吸着体として有用である。ウイルスは、しばしば、細胞表面レセプターへのリガンド（例えば、CD4に対するgp120）を有する。また、ファージ提示ライブラリーの形態では、ファージコートタンパク質は、標的への結合を試験するための因子として作用する。生物特異的相互作用吸着体は、上記のような公知の特異的相互作用に頼る。吸着体が利用され得る生物特異的相互作用の他の例は、当業者に容易に理解され、そして本発明によって意図される。

1つの実施態様では、生物特異的吸着体は、標的被分析物を結合することに直接関与しない補助または「ヘルパー」分子をさらに含み得る。

#### i. 結合特異性の程度

相互作用の種々の態様を有する吸着体への曝露によって、試料の成分は、種々の吸着体との相互作用に基づいて大きく分離され得る。したがって、種々の態様の相互作用を有する吸着体に対する被分析物の引力は、第1の分別パラメータを提供する。例えば、疎水性に関する引力に基づく第1の吸着体およびイオン電荷に関する引力に基づく第2の吸着体に、被分析物を含む試料を曝露することによって、疎水性吸着体に結合する被分析物を試料から分別すること、および特定のイオン電荷を有する吸着体に結合する被分析物を分別することが可能である。

引力の異なる基礎を有する吸着体は、吸着体が、被分析物だけでなく、引力の同じ基礎によって吸着体に対する引力を示す試料中の何らかの他の成分も結合す

るので、低い程度の特異性で被分析物の分離を提供する。例えば、疎水性吸着体は、疎水性被分析物だけでなく、試料中の任意の他の疎水性成分も結合し；負に荷電した吸着体は、正に荷電した被分析物だけでなく、試料中の任意の他の正に荷電した成分も結合するなどである。

吸着体に対する被分析物の引力の基礎に基づく被分析物の分離は、比較的中間の特異性または変化した引力の強度の結合特性を利用することによって、さらに洗練され得る。中間の特異性の結合特性を基礎とする被分析物の分離は、例えば、混合した機能性吸着体を利用することによって、達成され得る。被分析物の分離が比較的低い特異性で達成されると、目的の被分析物を誘引することが見いださ

れる結合特性は、さらに多くの望ましくない成分を除去し、それによって被分析物を分離するために、種々の他の結合および溶離特性と組み合わせて利用される。

例えば、被分析物が疎水性吸着体に結合するならば、被分析物は、引力の1つの基礎として疎水性相互作用を示し、そしてまた引力の第2の異なる基礎を示す、混合された機能性吸着体を提供することによって、他の疎水性試料成分からさらに分離され得る。混合された機能性吸着体は、正に荷電した疎水性被分析物を結合するように、疎水性相互作用および負に荷電したイオン相互作用を示し得る。あるいは、混合された機能性吸着体は、吸着体において金属イオンとの配位複合体を形成する能力を有する疎水性被分析物を結合するように、疎水性相互作用および金属イオンとの配位共有結合を形成する能力を示し得る。中間の特異性の結合特性を示す吸着体のなおさらなる例は、上記の開示および例に基づいて当業者に容易に理解される。

中間の特異性の結合特性を基礎とする被分析物の分離は、比較的高い特異性の結合特性を利用することによって、さらに洗練され得る。比較的高い特異性の結合特性は、引力の同じ基礎であるが引力の異なる強度を示す種々の吸着体を利用することによって利用され得る。言い換えれば、引力の基礎は同じであるが、他の試料成分からの被分析物のさらなる分離は、被分析物についての親和性の異なる



る程度を有する吸着体を利用することによって達成され得る。

例えば、被分析物の酸性性質に基づく吸着体を結合する被分析物は、特定の酸性pH範囲における被分析物への親和性を有する吸着体を利用することによって、他の酸性試料成分からさらに分離され得る。したがって、被分析物は、pH1～2の試料成分に誘引される1つの吸着体、pH3～4の試料成分に誘引される別の吸着体、およびpH5～6の試料成分に誘引される第3の吸着体を使用して分離され得る。このように、5～6のpHの被分析物を結合する吸着体への特異的親和性を有する被分析物は、1～4のpHの試料成分から分離される。特異性が増加した吸着体は、引力の間隔、すなわち、引力の同じ基礎を示す吸着体の結合特性間の差を減少させることによって利用され得る。

一次吸着体に吸着した一次被分析物は、それ自体、吸着体特性を有し得る。こ

の場合、基材に吸着した一次被分析物は、二次被分析物を単離するための二次吸着体になり得る。次に、保持された二次被分析物は、試料から三次被分析物を単離するために三次吸着体として機能し得る。このプロセスは、数回の反復によって持続し得る。

## 2. 溶離物

溶離物、または洗浄溶液は、被分析物と吸着体との間の吸収の閾値を選択的に改変する。溶離物が結合した被分析物を脱離および溶離する能力は、溶離特性の機能である。異なる溶離物は、大きく異なる溶離特性、幾分異なる溶離特性、または微妙に異なる溶離特性を示し得る。

溶離物が吸着体に接触する温度は、選択される特定の試料および吸着体の機能である。代表的には、溶離物は、0℃と100℃との間、好ましくは4℃と37℃との間の温度で、吸着体に接触する。しかし、いくつかの溶離物については、改変された温度は、所望の温度であり得、そして当業者によって容易に決定される。

吸着体の場合のように、大きく異なる溶離特性を示す溶離物は、一般的に、引力の基礎で異なる。例えば、溶離物と被分析物との間の引力の種々の基礎には、電荷またはpH、イオン強度、水構造、特異的競合結合試薬の濃度、表面張力、誘電率、および上記の2つ以上の組み合わせが挙げられる。

#### a. pHに基づく溶離物

pH (すなわち、電荷) に基づく吸着体の選択性を改変する溶離物には、公知のpH緩衝液、酸性溶液、および塩基性溶液が挙げられる。特定のpH緩衝液で所定の吸着体に結合した被分析物を洗浄することによって、電荷は改変され得、したがって特定のpH緩衝液の存在における吸着体と被分析物との間の結合の強度がチャレンジされ得る。溶離物のpHで吸着体について他のものよりも低い競合であるこの被分析物は、吸着体から脱離されそして溶離し、溶離物のpHで吸着体により強く結合する被分析物のみを結合させておく。

#### b. イオン強度に基づく溶離物

イオン強度に関して吸着体の選択性を改変する溶離物には、種々の型および濃度の塩溶液が挙げられる。溶離溶液に溶解された塩の量は、溶離物のイオン強度に影響を及ぼし、そして対応して吸着体結合能力を改変する。低濃度の塩を含む溶離物は、イオン強度に関して吸着体結合能力のわずかな改変を提供する。高濃度の塩を含む溶離物は、イオン強度に関して吸着体結合能力のより大きな改変を提供する。

#### c. 水構造に基づく溶離物

水構造または濃度の変更によって吸着体の選択性を改変する溶離物には、尿素およびカオトロピック塩溶液が挙げられる。代表的には、尿素溶液は、例えば、0.1~8Mの濃度の範囲の溶液を含む。溶離物を提供するために使用され得るカオトロピック塩には、チオシアン酸ナトリウムが挙げられる。水構造に基づく溶離物は、水和または結合水構造の変化に起因して被分析物を結合する吸着体の能力を改変する。この型の溶離物には、例えば、グリセロール、エチレングリコール、および有機溶媒が挙げられる。カオトロピックアニオンは、非極性部分の水溶解度を増加させ、それによって被分析物と吸着体との間の疎水性相互作用を減少させる。

#### d. 界面活性剤に基づく溶離物

表面張力および被分析物構造に関する吸着体の選択性を改変する溶離物には、界面活性剤 (detergent) および界面活性剤 (surfactant) が挙げられる。溶離物

としての使用に適切な界面活性剤には、CHAPS、TWEEN、およびNP-40のようなイオン性および非イオン性界面活性剤が挙げられる。界面活性剤の疎水性および親水性基が導入される場合、疎水性相互作用が改変されるので、界面活性剤に基づく溶離物は、吸着体が被分析物を結合する能力を改変する。被分析物と吸着体との間、および被分析物内の疎水性相互作用は改変され、そして荷電基が導入される（例えば、SDSのようなイオン性界面活性剤を用いるタンパク質変性）。

#### e. 疎水性に基づく溶離物

誘電率に関して吸着体の選択性を改変する溶離物は、疎水性相互作用に関して吸着体の選択性を改変する溶離物である。この能力において機能する適切な溶離物の例には、尿素(0.1~8M)、プロパノール、アセトニトリル、エチレングリコールおよびグリセロールのような有機溶媒、ならびに上記のような界面活性剤が挙げられる。溶離物としてのアセトニトリルの使用は、代表的には、逆相クロマトグラフィーである。溶離物中のエチレングリコールの包含は、親硫黄吸着体との塩促進された相互作用から免疫グロブリンを溶離することに効果的である。

#### f. 溶離物の組み合わせ

適切な溶離物は、上記のカテゴリーのいずれかから選択され得るか、または上記の2つ以上の溶離物の組み合わせであり得る。上記の2つ以上の溶離物を含む溶離物は、複数の溶離特性に基づいて被分析物についての吸着体の選択性を改変し得る。

### 3. 2つのパラメータの変動性

異なる吸着体を選択することによって異なる結合特性を提供する能力、および異なる溶離物で洗浄することによって異なる溶離特性を提供する能力は、2つの異なるパラメータの変動を許容し、そのそれぞれは、被分析物が吸着体に結合される選択性を個々にもたらし得る。これらの2つのパラメータが広く変化し得るという事実は、広い範囲の結合引力および溶離条件を確実にし、そのため本発明の方法は、多くの異なる型の被分析物を結合しそれにより検出するために有用であり得る。

特定の試料を分析することにおける使用についての吸着体および溶離物の選択

は、たとえ被分析物の性質が未知であっても、試料、および特徴づけられるべき被分析物の特定の被分析物またはクラスの性質に依存する。代表的には、特に分析されるべき試料の組成が未知である場合、多様な結合特性および多様な溶離特性を示すシステムを提供することが有利である。広範な選択特性を示すシステムを提供することによって、目的の被分析物が1つ以上の吸着体によって保持される可能性が顕著に増加する。

化学または生化学分析の当業者は、広範な結合および溶離特性を示し、そして被分析物の最良の分離を提供する結合および溶離特性を観察するシステムを提供することによって、特定の被分析物を保持するために有用な選択条件を決定し得る。本発明は、広範な選択条件を含むシステムを提供するので、所定の被分析物についての最適結合および溶離特性の当業者による決定は、過度の実験の必要なしに容易に行われ得る。

#### C. 被分析物

本発明は、適切な選択条件の使用によって被分析物の特性を利用することによって、被分析物の種々の生物学的、化学的、または物理化学的特性に基づく被分析物の分離を可能にする。適切な選択条件の使用によって利用され得る被分析物の多くの特性には、疎水性指標（すなわち、被分析物中の疎水性残基の尺度）、等電点（すなわち、被分析物が電荷を有さないpH）、疎水性モーメント（すなわち、被分析物の両親媒性の尺度もしくは極性および非極性残基の分布の不斉の程度）、側面双極子モーメント（すなわち、被分析物中の電荷の分布における不斉の尺度）、分子構造因子（分子の骨格に沿った大きな側鎖の分布のような被分析物分子の表面外形における変動の原因である）、二次構造成分（例えば、ヘリックス、平行および逆平行シート）、ジスルフィド結合、溶媒に曝露された電子ドナー基（例えば、His）、芳香族性（すなわち被分析物中の芳香族残基のうち $\pi$ - $\pi$ 相互作用の尺度）、および荷電した原子間の直線距離がある。

これらは、本発明の方法において適切な選択特性の選択によって、試料からの所定の被分析物の分離について利用され得る特性の型の代表的例である。試料からの特定の被分析物の分離についての基礎を形成し得る被分析物の他の適切な特

性は、当業者に容易に公知および／または決定可能であり、そして本発明によって意図される。

本発明の方法は、分析され得る試料の型に関して限定されない。試料は、固体、液体、または気体状態であり得るが、代表的には試料は液体状態である。固体または気体試料は、好ましくは、当業者内に周知の技術に従って液体試料を提供するように適切な溶媒に溶解される。試料は、生物学的組成物、非生物学的有機組

成物、または無機組成物であり得る。本発明の技術は、生物学的試料、特に生物学的液体および抽出物において被分析物を分離するために；ならびに、非生物学的有機組成物、特に低有機分子および低無機分子の組成物において被分析物を分離するために、特に有用である。

被分析物は、分子、多量体分子複合体、巨大分子凝集体、細胞、細胞オルガネラ、ウイルス、分子フラグメント、イオン、または原子であり得る。被分析物は、試料の単一成分、あるいは、共通して1つ以上の特徴（例えば、分子量、等電点、イオン電荷、疎水性／親水性相互作用など）を有する構造的、化学的、生物学的、または機能的に関連する成分の1つのクラスであり得る。

本発明の被保持物クロマトグラフィー方法を使用して分離され得る被分析物の特定の例には、生物学的巨大分子（例えば、ペプチド、タンパク質、酵素、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、核酸、炭水化物、オリゴ糖、多糖）；上記の生物学的巨大分子のフラグメント（例えば、核酸フラグメント、ペプチドフラグメント、およびタンパク質フラグメント）；上記の生物学的巨大分子の複合体（例えば、核酸複合体、タンパク質-DNA複合体、レセプター-リガンド複合体、酵素-基質、酵素インヒビター、ペプチド複合体、タンパク質複合体、炭水化物複合体、および多糖複合体）；小さな生物学的分子（例えば、アミノ酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、糖、ステロイド、脂質、金属イオン、薬物、ホルモン、アミド、アミン、カルボン酸、ビタミンおよび補酵素、アルコール、アルデヒド、ケトン、脂肪酸、ポリフィリン、カロテノイド、植物成長調節物質、リン酸エステルおよびヌクレオシド二リン酸-糖、合成小分子（例えば、薬学的または治

療的に有効な物質)、モノマー、ペプチドアナログ、ステロイドアナログ、インヒビター、変異原、発ガン物質、有糸分裂阻害剤、抗生物質、イオノホア、抗代謝物質、アミノ酸アナログ、抗菌剤、輸送インヒビター、表面活性剤(界面活性剤)、ミトコンドリアおよび葉緑体機能インヒビター、電子供子体、電子伝達体および電子受容体、プロテアーゼについての合成基質、ホスファターゼについての基質、エステラーゼおよびリパーゼについての基質、およびタンパク質改変試薬);ならびに合成ポリマー、オリゴマー、およびコポリマー(例えば、ポリアルキレン、ポリアミド、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリスルホン、

ポリスチレン、ポリエーテル、ポリビニルエステル、ポリカーボネート、ポリビニルハライド、ポリシロキサン、POMA、PEG、および上記の任意の2つ以上のコポリマー)が挙げられる。

### III. 情報処理

特定の溶離条件下で吸着体に吸着した被分析物の検出は、試料中の被分析物およびその化学的特徴についての情報を提供する。吸着は、一部は、吸着体の結合特性に依存する:吸着体に結合する被分析物は、結合を可能にする特徴を有する。例えば、特定のpHでカチオン性である分子は、そのpHを含む溶離条件下でアニオン性吸着体に結合する。強力なカチオン性分子は、非常に強い溶離条件下でのみ吸着体から溶離され得る。疎水性領域を有する分子は、疎水性吸着体に結合するが、親水性領域を有する分子は、親水性吸着体に結合する。また、相互作用の強度は、一部は、被分析物が疎水性または親水性領域を含む程度に依存する。したがって、試料中の特定の被分析物が特定の溶離条件下で吸着体に結合するという決定は、互いから、および結合についての適切な化学的特徴を有さない被分析物から、被分析物を分別することによって、混合中の被分析物を分離するだけでなく、特定の化学的特徴を有する被分析物のクラスまたは個々の被分析物をも同定する。種々の溶離条件下で1つ以上の特定の吸着体での被分析物保持についての情報を収集することは、混合物中の被分析物の詳細な分離だけでなく、同一性へと導き得る被分析物自体についての化学的情報もまた提供する。このデータは

、「保持データ」という。

保持アッセイで生成されるデータは、プログラム可能なデジタルコンピュータの使用で最も容易に分析される。コンピュータプログラムは、一般的には、コードを保存する読み取り可能な媒体を含む。あるコードは、基材アレイの各特徴の位置、その特徴での吸着体の正体、および吸着体を洗浄するために使用される溶離条件を含むメモリーに充てられる。次いで、この情報を使用して、プログラムは、ある選択特性を定義するアレイにおける特徴のセットを同定し得る。コンピュータはまた、入力として受けるコード、プローブにおける特定のアドレス可能な位置から受けた種々の分子量でのシグナルの強度についてのデータを含む。こ

のデータは、必要に応じて、検出される各被分析物についてシグナルの強度および決定された分子量を含む、検出された被分析物の数値を示し得る。

コンピュータはまた、データを処理するコードを含む。本発明は、データを処理するための種々の方法を意図する。1つの実施態様では、これは、被分析物認識プロファイルを生成することを包含する。例えば、分子量によって同定された特定の被分析物の保持についてのデータは、特定の結合特性、例えば、アニオン性吸着体または疎水性吸着体への結合に従って分類され得る。この収集したデータは、特定の被分析物の化学的特性のプロファイルを提供する。保持特性は、次に構造を反映する被分析物機能を反映する。例えば、配位共有金属キレーターへの保持は、ポリペプチド被分析物におけるヒスチジン残基の存在を反映し得る。種々のpHレベルでの溶離下で複数のカチオン性およびアニオン性吸着体への保持のレベルのデータを使用することで、タンパク質の等電点を導き得る情報が明らかになる。これは、次に、タンパク質中のイオン性アミノ酸の推定数を反映する。したがって、コンピュータは、結合情報を構造情報に変換するコードを含み得る。さらに、被分析物の二次プロセッシング（例えば、翻訳後修飾）によって、結合および量の差異によって反映される変化した認識プロファイルを得る。

他の実施態様では、保持アッセイは、2つの異なる細胞型における同じセットの選択閾値下で行われ、そして2つのアッセイからの保持データが比較される。保持マップ（例えば、任意の特徴でのシグナルの存在または強度）における差異

は、2つの細胞によって別々に発現される被分析物を示す。これは、例えば、2つの保持アッセイ間のシグナル強度の差異を示し、それによって被分析物が、2つのアッセイにおいて吸着体によって増加してまたは減少して保持されることを示す、差異マップを生成することを包含し得る。

コンピュータプログラムはまた、入力としてプログラマーからの指示を受けるコードを含み得る。アレイ中の特定された、所定の位置からの被分析物の選択的脱離について進行的経路および論理的経路は、予測されそして予めプログラムされ得る。

コンピュータは、データを表示のための他のフォーマットに変換し得る。データ分析は、例えば、収集したデータから特徴位置の関数としてのシグナル強度を

決定する工程、「アウト라이어」（所定の統計学的分布から逸脱するデータ）を除去する工程、および残りのデータから被分析物の相対結合親和性を算出する工程を包含し得る。

得られるデータは、種々のフォーマットで表示され得る。1つのフォーマットでは、シグナルの強度は、分子量の関数としてグラフで表示される。「ゲルフォーマット」と呼ばれる、他のフォーマットでは、シグナルの強度は、暗さの直線軸強度に沿って表示され、ゲルにおいてバンドに類似の出現を得る。他のフォーマットでは、ある閾値に達するシグナルは、分子量を表す横軸上に垂直な線またバーとして表示される。したがって、各バーは、検出された被分析物を表示する。データはまた、結合特性および/または溶離特性に従ってグループ分けされた被分析物についてのシグナル強度のグラフで表示され得る。

#### IV. 被保持物クロマトグラフィーの適用

被保持物クロマトグラフィーは、同時に多数の被分析物の検出および特徴づけを含む、組合せ的な分別方法に関する。これらの組合せ的な方法は、多くの適用を有する。このような適用には、限定されることなく、標的被分析物検出スキームを開発すること；タンパク質精製方策を開発すること；タンパク質精製方法；相補的ファージ提示ライブラリーを使用する標的エピトープ同定を含む、標的被分析物に結合するファージ提示ライブラリーから特定のファージを同定すること



；被分析物の物理化学的特性に基づくタンパク質同定；遺伝子発現モニタリングおよび示差的なタンパク質提示；毒性学スクリーニング；多数の診断マーカーの同時検出；薬物発見；多量体タンパク質会合モニタリングおよびインビトロポリヌクレオチド翻訳の検出が挙げられる。

#### A. 試料から被分析物を連続的に抽出する方法

被保持物クロマトグラフィーは、複数の吸着体/溶離条件下での被分析物の保持の分析に関する。この方法の1つの変更は、連続的抽出である。連続的抽出では、試料は、2つの異なる選択条件に独立して曝露されない。むしろ、試料は、吸着体への試料からのある被分析物を抽出し、そして溶離物中で非吸着被分析物

を放出するために、第1の選択条件に曝露される。次いで、溶離物は、第2の選択条件に曝露される。これは、さらに、溶離物から種々の被分析物を抽出する。頻繁には、第1および第2の曝露において吸着体が引力についての異なる基礎（例えば、順相および疎水性）を有する場合、吸着体は、溶離物から被分析物の異なるセットを抽出する。この第2の溶離物は、次いで、第3の選択条件に曝露され、そして以下同様である。連続抽出を実施する1つの方法では、吸着体は、試料がその上部で混合され得るように、ウェルの底部に置かれる。溶離物が、吸着物に添加され、そして試料において被分析物間の結合を可能にし、溶離物洗浄液が収集される。次いで、収集した洗浄液は、第2の吸着体に曝露され、そして被分析物が結合によって試料から抽出される。

1つの実施態様では、連続抽出の目的は、分析よりもむしろ調製である。より詳細には、目的は、試料から所望の被分析物以外のすべてを抽出することであり得る。この場合、試料は、通常、小さく、例えば、約数ミリメートル直径のスポットでの数マイクロリットルである。吸着体は、試料から枯渇することを望まない被分析物を吸着しないように選択される。数回の反復の後、最後に収集した洗浄物は、望ましくない被分析物を枯渇し、例えば、脱離分光測定法または伝統的クロマトグラフ方法による続いての分析のために所望の被分析物を残す。

他の実施態様では、保持されない試料は、それ自体、任意の分析技法によって被分析物について分析される。単一の保持工程の後でさえ、このプロセスによ

て、吸着体に吸着される材料および吸着されない被分析物を検査が可能になる。

#### B. 試料中の被分析物の進行的分離のための方法

被保持物クロマトグラフィーの1つの目的は、複合試料混合からの被分析物の明確な分離である。これは、臨床的診断、薬物発見、および機能的ゲノム学における適用に特に重要である：これらの領域は、生物学的試料からの1つ以上の被分析物の同定に関連し得る。本発明は、被分析物についての改良された分離での選択条件を同定するための方法を提供する。この方法は、被分析物が保持される選択条件を同定する工程、および反復プロセスにおいて、被分析物の改良された分離を提供する追加の結合特性または溶離特性を、この選択条件に追加する工

程を包含する。

選択条件に曝露された複合試料のマススペクトルは、一般的に、試料の多くの成分からのシグナルを含む。シグナルの複雑性は、被分析物の明確な分離を妨害し得る。被分析物の進行的分離の方法は、試料中の被分析物の明確な検出のための被分析物の改良された分離で選択条件を同定することを可能にする。選択条件は、被分析物シグナルが他の成分のシグナルとより容易に区別可能であるならば、他の選択条件と比較した被分析物の「改良された分離」を示す。これは、例えば、吸着体に結合した被分析物の数を減少させ、それによってシグナルの総数を減少させること、または被分析物についての選択条件の選択性を増加させ、それによって他のシグナルと比較した被分析物シグナルを増強することを包含し得る。もちろん、被分析物が基材に独占的に結合した場合、検出中に単独の被分析物シグナルを生じる。

進行的分離の方法は、さらなる選択（結合または溶離）特性が、被分析物を保持することが公知の選択特性の定常セットに順次追加される、反復プロセスを包含する。第1の工程では、一連の選択条件は、標的被分析物を保持する条件を同定するためにテストされる。次の工程では、選択条件の1つ以上の選択特性が、さらなる分析についての定常セットについて選択される。

新しいセットの選択条件が生成される。新しいセットの条件のそれぞれは、定常セットにおいて選択された特性、および定常セットにはない少なくとも1つの

新しい条件を包含する。例えば、定常セットが、アニオン性吸着体および低塩溶離物を含むならば、新しい条件は、溶離物のpHを変化させることを包含し得る。これらの新しい変動のそれぞれは、被分析物の分離を改良する能力についてテストされ、そして改良された分離を有する1つの改変された選択条件が同定される。次の工程では、改良された分離を提供するさらなる選択条件が、定常セットに追加される。

改変された定常セットは、定常セットの特性および新しい特性のセットを含む新しセットの選択条件を生成することによって、同様に再度テストされる。したがって、各工程で、選択条件は、被分析物の分離が、これまでの工程で選択条件と比較して改良されるように選択される。

この方法は、実施例によって十分に記載される。細胞試料は、代表的には、数百またはおそらく数千のタンパク質を含む。試料中の単一の標的タンパク質の被分析物の明確な分離を得ることが望まれ得る。第1の工程では、保持マップは、複数の選択条件を使用して標的被分析物について開発される。例えば、吸着体は、アニオン交換体、カチオン交換体、順相吸着体、および逆相吸着体であり得る。各吸着体でテストされた溶離条件は、種々のpHレベル、種々のイオン強度、種々の界面活性剤条件、および種々の疎水性に基づく条件であり得る。例えば、4つの異なる溶離条件が、各条件についてテストされ得る。したがって、この実施例では、16の異なる選択条件が、標的被分析物を吸着する能力についてテストされる。

この保持マップから、標的被分析物が保持される少なくとも1つの選択条件を選択する。標的が最大に結合した選択条件を選択し得る。しかし、この選択条件が他の選択条件よりも標的に対してより選択的である場合、標的が最大に結合されない条件を選択することが有利であり得る。この例については、保持マップの分析が、標的はほぼ中性のpHでアニオン交換吸着体によって保持されるが、親水性吸着体にも弱く吸着されることを示すと推定される。

被分析物の保持を得ることが同定された選択条件からの1つの可変の吸着体または溶離物は、次いで、すべての後の選択条件における使用について選択される

。本明細書で使用される場合、これは、「選択条件定常のセット」に添加されるといわれる。

次の反復では、標的被分析物が第2の複数の選択条件下で結合する能力をテストする。第2のセットでの各選択条件は、選択条件定常セットの要素を含む。しかし、各選択性はまた、他の可変物（選択条件に添加される異なる吸着体または溶離物）を含む。したがって、少なくとも定常のセットを用いる制約内で、選択条件の第2のセットはまた、第1のセットよりさらに多様であるように選択される。多様性を増加させる方法は、例えば、溶離条件のより精細な階級付けまたは吸着体の種々の強度をテストする工程を包含する。また、例えば、選択条件への他の選択特性の添加を包含し得る。

例を続けると、アニオン交換吸着体は、定常のセットに添加され得る。この条

件は、現在、より広範な種々の可変物、例えば、溶離物または吸着体とテストされる。テストされるべき溶離物は、最初の反復でテストされるよりも精細な階級付けで、種々の低pH緩衝液を含み得る。例えば、最初の反復は、pH3.0、pH5.0、pH7.0、およびpH9.0での緩衝液をテストし、そして標的が、ほぼ中性のpHでアニオン交換吸着体に結合したことを示した。第2の反復中、テストした緩衝液は、pH5.0、pH5.5、pH6.0、pH6.5、pH7.0、pH7.5、およびpH8.0であり得る。さらに、これらの緩衝液のそれぞれはまた、他の溶離特性、例えば、イオン強度、疎水性などを含むように変化され得る。

この段階で得られる第2の保持マップの分析は、一般的に、第1のラウンドで同定される選択条件よりも良好な分離を提供した条件を同定させる。また、この選択条件の可変物の1つが選択され、そして次の反復におけるさらなる疑問についての選択条件定常のセットに添加される。

例を続けると、被分析物を最もよく分離する第2のラウンドでの選択条件は、pH6.5で緩衝液を使用すると仮定する。この溶離物は、今度は、定常のセットに添加され得、これは今度は、アニオン交換樹脂およびpH6.5緩衝液を含む。次の反復では、選択条件は、この定常セット、および他の可変物を含む。可変物は、例えば、異なるイオン強度のような溶離物への新しい成分の添加であり得；また

は、他の吸着体は、アニオン交換吸着体と混合した種々の疎水性吸着体のような混合物に添加され得；または、アニオン交換樹脂の密度を変化させ得る。また、選択条件は、被分析物の改善された分離を示すこのセットから同定される。

被分析物が本質的に均一に精製されるまで、このプロセスは継続され得る。この場合、選択条件は、被分析物に特異的である。

各工程でテストされる可変物の数を増加させることによってわかり得るように、適切な選択条件を同定するために必要とされる反復の数を減少させ得る。

### C. 被分析物の調製用精製の方法

他の局面では、本発明は、被分析物を精製する方法を提供する。この方法は、被分析物を吸着するための引力の基礎を迅速に同定するための被保持物クロマトグラフィーの能力を利用する。第1の工程は、複数の選択条件に被分析物を曝露

する工程、および被保持物クロマトグラフィーによってこの条件下で保持を決定する工程を包含する。これは、被分析物の認識プロファイル特性を生成する。被分析物が保持される選択条件は、被分析物の調製用精製のためのプロトコルを開発するために使用される。

被分析物の調製用精製について、被分析物は、引き続いて吸着され、そして被分析物を結合すると同定された一連の吸着体／溶離物の組合せから溶離される。したがって、例えば、認識マップは、被分析物が、順相吸着体および金属キレート剤に結合することを示し得る。次いで、被分析物は、例えば、被分析物を結合する順相吸着体を含む、第1のクロマトグラフィーカラムと接触する。結合していない材料は洗い流される。次いで、被分析物は、十分にストリンジェントな洗浄によって溶離される。次いで、溶離物は、例えば、被分析物を結合するために、金属キレートカラムと接触させる。結合していない材料は、洗い流される。次いで、被分析物を含む結合した材料は、金属キレートカラムから溶離される。このように、被分析物は、調製量で単離される。試料の調製量は、少なくとも $10\mu\text{l}$ 、少なくとも $100\mu\text{l}$ 、少なくとも $1\text{ml}$ または少なくとも $10\text{ml}$ である。

被分析物の進行的分離中に生成した情報は、大規模クロマトグラフ（溶離に基づく）タンパク質精製方策を設計するために使用され得る。標的被分析物タンパ

ク質についての、引力についての吸着体基礎、結合条件、および溶離条件（すなわち、選択条件）は、被保持物クロマトグラフィーによって定義される。この情報は、大量の時間、エネルギー、およびここで適切である精製方策決定の試行錯誤プロセス中に、他の方法では浪費される貴重な被分析物を節約し得る。この節はまた、市販の吸着体で行った大規模精製努力を提供する。

#### D. 被分析物の特異的検出のためのプローブを作製する方法

本発明は、脱離スペクトロメトリーによる1つ以上の被分析物の特異的検出のためのプローブ、ならびにこれらのプローブを作製するための方法を提供する。このような被分析物を分離するプローブは、診断および分析方法において被分析物を特異的に検出するために有用である。

1つ以上の被分析物を分離するためのプローブを作製する第1の工程は、複数

の異なる吸着体/溶離物組み合わせ下で被分析物についての保持マップを產生することである。例えば、被分析物の分離は、5つの異なる溶離物のそれぞれで洗浄した4つの異なる吸着体について決定され得る。これは、被分析物のそれぞれについての保持データの20のセットを提供する。得られる保持マップの分析は、どの1つまたは複数の選択条件が被分析物を最もよく分離するかを示す。好ましくは、被分析物をすべて明確に分離する1つの選択条件が選択される。次いで、被分析物のそれぞれが少なくとも1つの吸着体スポットで分離されるように被分析物が分離するプローブでの使用について、1つ以上の選択条件が選択される。プローブはまた、1つまたは複数の被分析物を結合しない吸着体を含み得る。この吸着体スポットは、コントロールとして有用である。プローブは、1つまたは複数の被分析物を保持および分離する能力について選択されるアドレス可能な位置に、複数の吸着体スポットを含み得る。この場合、単一の溶離条件下で被分析物を結合する吸着体が、選択される。プローブ全体が検出プロセスにおいて単一の溶離物で洗浄され得るので、これは有用である。

特定の被分析物について生成される保持マップは、被分析物についてカスタマイズされた吸着体を生成するために使用され得る。例えば、被分析物を保持する吸着体の性質は、被分析物の引力についての基礎のセットを示す。カスタマイズ

された吸着体は、引力についてのこれらの基礎を提供する吸着体の要素を含む複合吸着体を調製することによって設計され得る。このようなカスタム吸着体は、標的被分析物について非常に選択的である。1つまたは少数のカスタム吸着体が、被分析物についての認識マップを生成するために十分であり得る。例えば、特定の溶離条件下で、被分析物が、ある程度の疎水性、正電荷、および芳香性を有する材料を結合する吸着体によって保持される場合、設計によって、またはこれらの3つの特性のそれぞれを誘引する官能基を有する組合せ的な合成方策の使用によって、カスタム吸着体を生成し得る。この吸着体への結合を検出することで、被分析物を同定する。

このようなプローブは、試料中の1つまたは複数の被分析物を検出するために有用である。試料は、選択条件に曝露され、そしてプローブは、脱離分光測定法によって問い合わせられる。プローブが被分析物を分離するので、その存在は、特

性認識プロファイルを捜すことによって検出され得る。このようなプローブは、患者試料中で診断マーカーのセットを同定するのに特に有用である。

1つの実施態様では、アレイは、目的のタンパク質の特定のクラスをドッキング (dock) させるように設計される。これは、診断マーカーおよび機能によって定義される被分析物を含む。例えば、細胞表面タンパク質、あるクラスの酵素 (例えば、キナーゼ)、転写因子、細胞内レセプターなどを特異的にドッキングさせるアレイが、調製され得る。吸着体は、バイオポリマー、例えば、抗体に特異的であり得る。

1つの実施態様では、吸着体は、タンパク質のあるクラスについてのファージ提示タンパク質リガンドのような遺伝子パッケージである。この場合、ファージ提示ライブラリーは、クラスに結合するファージを排除するためにあるクラスの分子で予備スクリーニングされ得る。次いで、集団から差し引かれたファージは、吸着体として使用される。

#### E. 診断プローブおよび診断方法

病理学的状態の診断は、しばしば、病気の1つ以上の分子マーカーの患者試料での検出を含む。ある症状は、単一の診断マーカーの存在によって診断され得る

。他の症状の診断は、複数の診断マーカーの検出を包含し得る。さらに、いくつかのマーカーの検出は、診断の信頼性を増加させ得る。したがって、本発明は、病理学的状態の少なくとも1つの診断マーカーを分離する少なくとも1つの吸着体を含む、脱離分光測定法のためのプローブを提供する。

このようなプローブの調製は、まず、検出されるべきマーカーの選択を包含する。マーカーは、何らかの病状、例えば、ガン、心臓病、自己免疫疾患、ウイルス感染、アルツハイマー病、または糖尿病についてのマーカーであり得る。例えば、前立腺特異的抗原 (PSA) の検出は、前立腺ガンを非常に暗示する。HIV感染は、p17、p24、またはp55の1つ、およびp31、p51、またはp66の1つ、およびgp41またはgp120/160の1つのような、いくつかのHIVタンパク質に対する抗体を検出することによって診断され得る。脳脊髄液中のアミロイド- $\beta$ 42および $\tau$ タンパク質の検出は、アルツハイマー病を非常に暗示する。また、マーカーは、健康

被験体対病理学的状態を有する被験体における被分析物の差異の存在を検出する工程を包含する、本発明の方法によって同定され得る。

次の工程では、1つ以上の診断マーカーを保持する吸着体が、開発される。好ましくは、すべてのマーカーを分離する単一の吸着体が調製される。これは、例えば、それぞれが所望のマーカーの1つを結合する、いくつかの抗体を含むスポットを生成することによって、達成され得る。あるいは、プローブは、複数の吸着スポットを含み得、各スポットは、選択条件下で少なくとも1つの標的被分析物を分離し得る。1つの実施態様では、吸着体は、マーカーに特異的であるリガンドを含む複合吸着体である。例えば、吸着体は、標的被分析物を特異的に結合する抗体、ポリペプチドリガンド、またはポリヌクレオチドを含み得る。1つの実施態様では、抗体は、組合せ的なライブラリーをスクリーニングすることによって同定される単鎖抗体である。特定のマーカーに特異的である単鎖抗体は、本明細書に記載の方法によってファージ提示ライブラリーをスクリーニングすることによって開発され得る。

他の実施態様では、吸着体は、標的被分析物を特異的に保持するか、または脱離分光測定法によって明確な分離に十分な特異性で被分析物を保持するかのいずれ



かの、非有機生体分子成分を含む。特異的被分析物の検出のための吸着体の調製も、本明細書に記載される。

顕著には、これらの方法に使用される単一吸着スポットは、単一被分析物に特異的である必要はなく、したがって、標的と吸着体との間のバイオポリマー媒介特異的親和性を必要とする必要はない。以前の親和性検出方法は、主として、バイオポリマーと標的との間の特異的結合に依存していた。これは、例えば、タンパク質に対する抗体、相補的ポリヌクレオチドに対するポリヌクレオチド、または炭水化物に対するレクチンの特異的親和性を含む。これらの検出手段が間接的であるのでこのような特異性が必要であった：標的は同定されなかった；しばしば吸着体に結合した標識が同定された。したがって、吸着体が特異的であるほど、夾雑物が吸着体に結合しそして特異的検出を妨害する可能性が少なくなる。しかし、脱離分光測定法によって、被分析物の直接的検出を得る。したがって、夾雑物のシグナルが標的のシグナルと重複しない限り、夾雑物の存在は特異的検出を

妨害しない。

診断の方法は、第1に、テストされるべき患者試料を選択する工程を包含する。試料は、例えば、組織、血液、尿、大便、または他の体液（リンパ液、脳脊髄液、関節内液など）であり得る。次いで、試料は、診断マーカーの保持を可能にする条件下で診断吸着体を含む基材に曝露される。吸着体は、適切な溶離物で洗浄される。次いで、マーカーは、脱離分光測定法（例えば、マススペクトル測定）によって検出（例えば、分離）される。

本発明はまた、(1)吸着体および溶離物を含む選択条件下で少なくとも1つの診断マーカーを分離する少なくとも1つのアドレス可能位置で少なくとも1つの吸着体を含む脱離分光測定法における使用のための基材、および(2)溶離物の調製のための溶離物または装置を含む、診断マーカーの特異的検出のためのキットを提供する。吸着体に試料を曝露しそして溶離物で洗浄すること、すなわち、選択条件を実行することによって、被分析物は、十分に精製または脱離分光測定法によって分離のために特異的に結合される。

#### F. タンパク質を同定する方法

他の局面では、本発明は、タンパク質の同定を援助する方法を提供する。この方法は、被保持物クロマトグラフィーを使用してタンパク質被分析物の物理化学的特徴についての一致パラメータを決定する工程、および一致パラメータを有するタンパク質を同定するためにタンパク質データベースを検索する工程を包含する。被保持物特性に基づく物理化学的情報の誘導は、上で論議される。データベースは、代表的には、アミノ酸配列および／または各タンパク質のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を提供する。分子量、疎水性、 $pI$ 、フラグメント質量などのような構造特性は、この情報から容易に導き出せる。被分析物タンパク質は、データベースにおいてタンパク質のサブセットのみと任意の特定の構造特性を共有する。したがって、同一性候補物は、タンパク質被分析物と共有される構造特性に従って、タンパク質を分類することによって見いだされる。したがって、参照物の1つ以上の物理化学的特性を同定することに固有の不正確さ、特異性の程度、または確実性のレベルを考えると、データベースにおけるタンパク

質が、参照物のすべての特徴に完全に一致することを予期し得ない。したがって、一致パラメータは、例えば、タンパク質被分析物特徴とデータベース中の参照ポリペプチドの特徴との間の適合の近似を同定するために設定され得る。

本発明者らの、ゲノム中の遺伝子の同定が増加するにつれて、任意のタンパク質被分析物が参照ポリペプチドとしてデータベース中に存在する機会も増加する。したがって、この方法は、試料中の目的のタンパク質を迅速に分離し、タンパク質についての構造情報を得、次いでタンパク質を同定するためにこの情報を使用することを可能にする。

#### G. マルチマー分子を会合させる方法

吸着体が所望の分子をドッキングさせる能力は、マルチマー分子を組み立て、そしてその会合をもたらす化合物を評価することに有用である。マルチマー分子のユニットは、吸着体に結合される。次いで、これは、マルチマー分子の他のユニットを含む試料に曝露される。曝露は、結合パラメータをテストするための種々の条件下で行われ得る。サブユニットのマルチマーへの結合は、脱離分光測定

法によってモニターされ得る。次いで、その後のサブユニットは、同様に結合についてテストされ得る。本明細書に記載の薬物スクリーニング方法は、会合を妨害する能力について物質をテストするために有用である。したがって、プロセスの1つの段階での被分析物は、次の段階で吸着体になる。

#### H. 酵素アッセイを行うための方法

本発明はまた、酵素アッセイを行うための方法を提供する。酵素アッセイは、一般的に、酵素が活性である条件下で、酵素基質とテストされるべき試料とを曝露する工程を包含する。酵素を基質上で作用させた後、酵素反応の産物が検出される。定量アッセイでは、産物の量が決定される。この量は、通常、コントロールまたは標準曲線と比較され、それによって試料中の酵素活性の量を得る。

本発明は、試料中で酵素活性の量を検出する工程を包含する、酵素を検出する方法を提供する。この方法は、酵素の活性が、しばしば、質量が元の基質とは異なる産物を産生するという事実を利用する。この方法では、基質を結合する吸着

体を含む固相が調製される。ある量の基質が、吸着体に結合される。次いで、吸着体は、任意の酵素が基質上で作用する条件下でおよびその時間にわたって試料に曝露される。次いで、何らかの結合した材料は、脱離分光測定法によって検出される。酵素活性の産物の分子量特性を有する被分析物の検出は、酵素の存在の指示を提供する。シグナル強度は、試料中の酵素活性の量の関数である。

#### I. 生物学的材料間で示差的に発現される被分析物を同定する方法

他の局面では、本発明は、2つ以上の試料間で示差的に発現される有機生体分子、特にタンパク質を同定する方法を提供する。「示差的発現」とは、2つの試料間での被分析物の量または質の差異をいう。このような差異は、転写から翻訳後修飾までのタンパク質発現のいずれかの段階で生じ得る。方法は、被保持物クロマトグラフィーの並外れた分離の能力および感度を利用する。第1に、選択条件の同じセットを使用する認識プロファイルは、2つの生物学的試料からの被分析物について調製される。使用される選択条件の数が多いほど、試料中の被分析物の分離が大きく、したがって、比較され得る被分析物の数が多い。次いで、認識マップは、2つのセットの吸着体によって示差的に保持される被分析物を同

定するために比較される。示差的保持は、定量的保持を含む。これは、例えば、発現のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションを示す。示差的保持はまた、非化石仏中の定性的差異も包含する。例えば、タンパク質の翻訳後修飾の差異は、結合特性の差（例えば、タンパク質がグリコシル化されるならば、レクチン吸着体に異なって結合する）、または質量の差異（例えば、翻訳後切断の差異の結果として）として検出可能な認識マップの差異を生じ得る。分析は、プログラム可能なデジタルコンピュータによって行われ得る。

この方法は、2つの細胞型間で示差的に発現される遺伝子を検出するために特に有用である。2つの細胞型は、正常対病的細胞、例えば、ガン細胞、または種々のレベルの細胞、または発生または分化の異なる段階での、あるいは細胞周期の異なる部分での細胞であり得る。しかし、この方法はまた、異なる条件に曝露された同じ型の2つの細胞を検査することに有用である。例えば、この方法は、細胞での遺伝子発現を調節する能力について薬剤を毒性スクリーニングおよびテ

ストすることに有用である。このような方法では、1つの生物学的試料は、テスト薬剤に曝露され、そして他の細胞は曝露されない。次いで、試料の被保持物質試料が比較される。この方法は、タンパク質または他の生体分子が、発現を増加または減少し、あるいは異なる被保持物特徴または異なる質量に基づいて何らかの形で変化する。

保持マップから得られる、示差的に発現したタンパク質の物理化学的特性についての情報を使用して、これらのタンパク質についての同一性候補は、本明細書に記載の方法を使用して決定され得る。

この方法は、病気の診断マーカーを同定するために有用である。または正常試料もしくは細胞と比較して、患者試料または疾患培養細胞で、示差的に発現されるタンパク質は、診断マーカーであり得る。一般的に、統計学的に有意な患者集団からの試料を正常試料と比較するために最良である。このように、情報は、その病状を示す個体のすべてまたは著しい数に普通の診断マーカーを同定するために蓄積され得る。

#### 1. 異化シグナル増幅による漸増感度

複合混合物中の大きなタンパク質の分化存在（例えば、分化発現から生じる）を検出する感度は、大きなタンパク質をより小さな小片にフラグメント化すること、およびより小さな小片を検出することによって顕著に増加され得る。増加した感度は、いくつかの因子に起因する。第1に、試料中のタンパク質すべてが、例えば、酵素的切断によってフラグメント化される場合、大きなタンパク質は、小さなタンパク質よりも多くのフラグメントを産生するようである。第2に、脱離スペクトロメトリの全体の感度は、より高分子量よりも低分子量で大きい。第3に、タンパク質をフラグメント化すると、標的からのシグナルの数が増加し、それによって標的を検出する可能性を増加させる。第4に、タンパク質をフラグメント化すると、捕獲の可能性が増加し、したがって、タンパク質の少なくとも1つのフラグメントを検出する。第5に、タンパク質が、2つの試料に別々に存在するならば、タンパク質からのシグナルの数を増加させることによって、量の差は、さらに検出されるようである。

また、この方法は直感に反する。一般的に、分析前に被分析物混合物の複雑性を減少させようと努める。フラグメント化は、複雑性を増加させる。

したがって、本発明の1つの実施態様では、被分析物を検出する感度は、検出前に被分析物をより低分子量フラグメントに変換することによって増加する。フラグメント化は、当該技術分野で公知の何らかの手段によって達成され得る。例えば、タンパク質被分析物は、エンドプロテアーゼを使用してフラグメント化され得る。炭水化物被分析物は、グリコシダーゼを使用してフラグメント化され得る。核酸は、エンドヌクレアーゼを使用してフラグメント化され得る。試料は、吸着体とのドッキングの前または後にフラグメント化に供せられ得る。

#### J. レセプターに対するリガンドを同定する方法

生物学的系における機能的経路は、しばしば、レセプターとリガンドとの間の相互作用を含む。例えば、転写活性化因の結合は、しばしば、リガンドの転写因子との先の結合を包含する。多くの病理学的状態は、レセプターとそのリガンドとの間の異常な相互作用に関連する。レセプターとリガンドとの間の結合の中断は、薬物発見の頻繁な標的である。しかし、レセプターに対するリガンドの同定

は、しばしば未知である；レセプターは「オーファン」レセプターである。

本発明は、レセプターに対するリガンドを同定するために被保持物クロマトグラフィーを使用する方法を提供する。この方法は、吸着体にレセプターをドッキングさせる工程を包含する。次いで、レセプターに対するリガンドを含むと推測されると思われる試料は、レセプターとリガンドとの間の結合に適切な溶離条件下で、ドッキングしたレセプターに曝露される。次いで、レセプターに結合しているリガンドは、脱離スペクトロメトリーによって検出される。この方法のパワーは、一部は、吸着体にドッキングした少量の材料を検出するために、脱離スペクトロメトリーに対する感度による。

レセプターを吸着体にドッキングすることは、レセプターを保持、および好ましくはレセプターに特異的に結合する吸着体を同定することを必要とする。タンパク質を特異的に結合する吸着体を同定する方法は、本明細書に記載される。1つの方法では、吸着体は、レセプターに特異的な抗体を含む。別の実施態様では、

レセプターは、特異的結合のための部分を含む組換え融合タンパク質として産生される。例えば、レセプターは、抗体のFc部分と融合され得る。このような部分は、吸着体に組み込まれ得るプロテインAに結合する。

リガンドの存在について試験される試料は、実施者の自由である。例えば、レセプターが核レセプターであるならば、試料は、核抽出物であり得る。レセプターが細胞質レセプターであるならば、試料は、細胞質抽出物であり得る。レセプターが細胞表面レセプターであるならば、試料は、細胞が曝露される表面からの液体、例えば、上皮細胞表面レセプターに対する血清であり得る。

試料は、一般的に、結合させるために十分な時間、生理学的条件下で、例えば、37℃にて数時間、レセプターとともにインキュベートする。次いで、結合していない材料が洗い流される。この方法は、従来の技術が同定するために数カ月を必要とするリガンドを、迅速に同定し得る。

被保持物クロマトグラフィーは、いくつかの吸着スポット上の試料の並行処理を可能にする。したがって、この方法は、リガンドの存在について複数の異なる

試料を試験する工程、ならびに複数のインキュベーションおよび溶離条件下で単一の試料を試験する工程を包含し得る。

同定されたりガンドの質量および種々の物理化学的特性を決定することによって、リガンドは、ゲノムデータベースからの情報を使用して明確に同定され得る。

この方法の別の実施態様では、細胞に曝露されそして細胞からのタンパク質をドッキングしたプローブのセットが調製される。このプローブは、それ自体、ドッキングした分子に結合する細胞からの分子を同定するために、二次プローブとして有用である。第2にプローブからの被保持物マップを調製した後、プローブは、一般的に、二次プローブを調製するために使用されるよりも低いストリンジエント条件下で、試験材料に曝露され、そしてアドレス可能位置が分析される。新しくプローブにドッキングされる分子は、既にドッキングした分子に結合された分子である。

#### K. 薬物発見の方法

レセプターとそのリガンドとの間の結合に介在する分子を同定することは、薬物を開発することに重要な工程である。本発明は、吸着体および被分析物を試験化合物に曝露する工程、ならびに吸着体および被分析物との間の結合を脱離スペクトロメトリーによって検出する工程によって、吸着体および被分析物との間の結合（例えば、レセプター吸着体およびリガンド被分析物）を調節する能力について、化合物をスクリーニングする方法を提供する。

薬物候補物についての組合せ的なライブラリーの迅速なスクリーニングは、数千の薬物に標的相互作用を曝露し、そして相互作用を妨害または促進する物質を同定する能力を必要とする。被保持物クロマトグラフィーは、リガンド/レセプター対の1つのメンバーを基材にドッキングし、そして二次吸着体としてそれを使用することが可能である。次いで、メンバーをそのパートナーにおよび物質に曝露した後、パートナーが結合したかどうかそしてどの程度結合したかを、脱離スペクトロメトリーによって決定し得る。スクリーニング方法における被保持物クロマトグラフィーの有利点は、レセプターを吸着体によって基材に特異的にド

ッキングさせる能力、並行処理について多くの吸着体スポット上のレセプターを迅速に展開する能力、および脱離スペクトロメトリーによる読み出し結果によって可能である処理能力のスピードを含む。

### 1. スクリーニングアッセイ

この方法は、吸着体を提供する工程；1つ以上の選択条件下で物質の存在および非存在下で標的被分析物と吸着体を接触させる工程、ならびに物質とのおよび物質なしのいずれかの結合の量を決定する工程を包含する。結合の量は、被保持物クロマトグラフィーによって（例えば、認識プロファイルを調製することによって）決定される。実験は、物質が添加されないコントロール、または物質の異なる量もしくは型が添加されそしてゼロ量が外挿によって決定されるコントロールで行われ得る。結合の量の統計学的に有意な差（ $p < 0.05$ ）は、試験物質が結合を調節することを示す。

この方法は、薬物標的候補物として被分析物（例えば、タンパク質）をスクリーニングすることに特に有用である。血清または他の標的細胞型からのタンパク質保持マップまたは認識プロファイルの開発の後、物質は、そのアドレス可能性

置で保持された被分析物のアレイに曝露される。結合をさせた後、結合していない物質は溶離または洗い流される。物質自体が保持マップ中の新しい成分として現れるので、特定された選択条件下で結合物質を保持したその被分析物は、脱離マスマスペクトロメトリーによって直接同定される（すなわち、物質は直接脱離して検出される）。この方法は、被分析物を結合するまたは1つ以上の生物学的プロセスを調節する能力について、薬物候補物、アゴニストおよびアンタゴニストの両方をスクリーニングするために特に有用である。

### 2. レセプターおよびリガンド

吸着体および標的被分析物は、特異的結合に携わる必要がない。しかし、特に有用な方法では、吸着体および標的被分析物は、リガンド／レセプター対である。

1つの実施態様では、リガンド／レセプター対は、ホルモンおよび細胞表面レセプターまたは細胞内レセプターである。吸着体は、細胞全体、または膜結合レ



セプターの場合は細胞膜であり得る。タンパク質レセプターまたは他の薬物標的候補物は、組合せ的な薬物ライブラリーをスクリーニングするために吸着体として使用され得る。数百または数千の薬物候補物は、単一のレセプター型またはアドレス可能位置に適用され得る。非結合および弱く結合した薬物候補物（すなわち、物質）の除去の後、結合した物質は、脱離スペクトロメトリーによって検出および同定される。

別の実施態様では、吸着体は、標的基質を結合しそして改変する酵素である。物質は、被分析物の酵素の形質転換を調節する能力についてスクリーニングされる。例えば、被分析物の認識プロファイルは、酵素活性の産物のプロファイルとは異なり得るので、酵素活性が検出され得る。分化保持は、物質が結台を変化させることを示す。

レセプター／レセプターは、種々の方法で基材上に保持され得る。1つの方法では、レセプター／リガンドは、非特異的吸着体によって直接保持される。別の方法では、吸着体は、レセプター／リガンドに特異的である。例えば、吸着体は、レセプター／リガンドに特異的な抗体を含み得る。レセプター／リガンドは、融合部分が、例えば、FcフラグメントがプロテインAを結合するように、吸着体を

特異的に結合する融合タンパク質であり得る。1つの方法では、レセプター／リガンドを特異的に結合するポリペプチドをその表面上に有する、ファージ提示ライブラリーからのファージのような、遺伝子パッケージは、基材に結合される。リガンドは、ポリペプチドによって捕獲される。また、吸着体は、基材にすでにドッキングされた被分析物であり得、すなわち、これは二次吸着体、三次吸着体などであり得る。

本発明は、標的に結合する薬物（または他の物質）の直接および間接的の両方の結果を評価するために特に有用な方法を提供する。標的細胞型のタンパク質から生成された被保持物マップにおける1つ以上の被分析物の検出は、1)その標的タンパク質自体、2)いくつかの他の被分析物（薬物結合タンパク質ではない）、または3)遺伝子発現（アップまたはダウンレギュレーション）において物質（

例えば、薬物候補物)の作用に起因して変更され得る。これは、これらの変化を検出するために被保持物クロマトグラフィーの高分離および情報生成力、すなわち、この方法を、プロテオミクス(proteomics)、機能的ゲノミクス(genomics)、薬物発見、治療薬物モニタリング、および臨床診断学に利用可能な最も強力なツールの1つにする、薬物ありおよびなしで観察される遺伝子被保持物マップまたは認識プロファイルの薬物誘導される差である。

### 3. 試験物質

プロチモシン(prothymosin)発現を調節する能力についてスクリーニングされるべき試験物質が、試験動物またはインビトロで培養された細胞に投与される。試験されるべき物質の選択は、実施者の裁量にゆだねられる。しかし、薬剤としての投与の多様性および容易さのため、低分子が、試験物質として好ましい。

#### a. 化学

試験されるべき物質は、多くの供給源から選択され得る。例えば、分子の組合せ的なライブラリーは、スクリーニングに利用可能である。このようなライブラリーを使用して、数千の分子が、調節活性についてスクリーニングされ得る。1つの好ましい実施態様では、高処理能スクリーニング方法は、多数の潜在的治療

化合物(候補化合物)を含むライブラリーを提供する工程を包含する。次いで、このような「組合せ的な化学ライブラリー」は、所望の特徴的活性を提示するライブラリーメンバー(特定の化学種またはサブクラス)を同定するために、本明細書に記載のように、1つ以上のアッセイでスクリーニングされる。従って同定された化合物は、従来の「リード化合物」として作用し得るか、または潜在的または実際の治療剤としてそれ自体が使用され得る。

組合せ的な化学ライブラリーの調製およびスクリーニングは、当業者に周知である。このような組合せ的な化学ライブラリーには、ペプチドライブラリー(例えば、米国特許第5,010,175号、Furka (1991) Int. J. Pept. Prot. Res., 37:487-493、Houghtonら (1991) Nature, 354:84-88を参照のこと)が挙げられるが、これらに限定されない。ペプチド合成は、決して、本発明での使用について予想および意図されるアプローチのみではない。化学的に異なるライブラリーを生

成するための他の化学も使用され得る。このような化学には、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ペプチド (PCT公開番号WO 91/19735, 1991年12月26日)、コードされたペプチド (PCT公開WO 93/20242, 1993年10月14日)、ランダムバイオオリゴマー (PCT公開WO 92/00091, 1992年1月9日)、ベンゾジアゼピン (米国特許第5,288,514号)、ヒダントイン、ベンゾジアゼピン、およびペプチドのようなジベルソマー (diversomer) (Hobbsら, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6909-6913)、ビニル様ポリペプチド (Hagiharaら (1992) J. Amer. Chem. Soc. 114:6568)、 $\beta$ -D-グルコースを足場とした非ペプチド性ペプチド模倣物 (Hirschmannら, (1992) J. Amer. Chem. Soc. 114:9217-9218)、小化合物ライブラリーの類似有機合成物 (Chenら (1994) J. Amer. Chem. Soc. 116:2661)、オリゴカルバメート (Choら, (1993) Science 261:1303)、および/またはペプチジルホスホネート (Campbellら (1994) J. Org. Chem. 59:658)。一般的には、Gordonら (1994) J. Med. Chem. 37:1385、核酸ライブラリー、ペプチド核酸ライブラリー (例えば、米国特許第5,539,083号を参照のこと)、抗体ライブラリー (例えば、Vaughnら (1996) Nature Biotechnology, 14(3):309-314、およびPCT/US96/10287を参照のこと)、炭水化物ライブラリー (例えば、Liangら (1996) Science, 274:1520-1522、および米国特許第5,593,853号を参照

のこと)、および低有機分子ライブラリー (例えば、ベンゾジアゼピン, Baum (1993) C&EN, 1月18日, 33頁、イソプレノイド米国特許第5,569,588号、チアゾリジノンおよびメタチアザノン米国特許第5,549,974号、ピロリジン米国特許第5,525,735号および同第5,519,134号、モルホリノ化合物米国特許第5,506,337号、ベンゾジアゼピン同第5,288,514号などを参照のこと)を参照のこと。

組合せ的なライブラリーの調製のためのデバイスは、市販されている (例えば、357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050および, Millipore, Bedford, MAを参照のこと)。

L. 被分析物を特異的に結合する物質を生成するための方法

本発明は、標的被分析物に特異的に結合する物質、例えば、単鎖抗体を生成するための方法を提供する。これらの物質は、例えば、リガンド／レセプター相互作用の研究において標的をドッキングさせるために特異的な診断物質として有用である。この方法は、動物を免疫することによって抗体を生成する可能でないかまたは実際のでないような少量で単離され得るのみである標的に対する物質を生成するために特に有用である。この方法は、そこに付着された標的を有する基材を提供する工程；スクリーニングされるべき物質を提示する遺伝子パッケージの提示ライブラリーを提供する工程；標的との相互作用によって遺伝子パッケージを特異的に保持するために、ライブラリーを標的に曝露する工程；および脱離スペクトロメトリーによって保持された遺伝子パッケージを検出する工程、を包含する。

これらの工程は、オフライン増幅および間接的検出手段に関連する標識方策を含む、分別選択および検出手順と関連する損失および曖昧さを移すことなく、多数の複合集団内の吸着体-被分析物候補物について並行で行われ得る。

### 1. 基材を提供する工程

この方法の第1の工程は、スクリーニングされるべき提示ライブラリーのポリペプチド物質について標的として作用する吸着体を含む基材を提供する工程を包

含する。1つの実施態様では、既に標的吸着体が付着された基材が、提供される。別の実施態様では、基材は、標的被分析物を結合する吸着体を有する基材を提供する工程、被分析物の保持を可能にする溶離条件下で吸着体を被分析物に曝露する工程、および提示ライブラリーについての標的として標的吸着体を使用する工程によって提供される。1つの実施態様では、標的は、比較される2つの細胞型間で分化発現される。例えば、標的は、分化発現したmRNAに由来し得るか、または分化発現したポリペプチドであり得る。被保持物クロマトグラフィー法によるこのような分化発現したタンパク質を同定する方法は、上に記載される。

分化発現したタンパク質被分析物が一旦同定されると、被分析物を明確に分離する選択条件を開発し得る。より好ましくは、被分析物の保持は、特異的または排他的である。上記の被分析物の進行的分離の方法は、複合試料から標的被分析

物を特異的に結合する選択条件を同定することを可能にする。1つの実施態様では、結合した標的は、例えば、酵素への曝露によって改変され得る。

あるいは、この方法は、mRNAまたはEST段階で開始し得る。この方法では、分化発現したmRNAまたはESTは、ルーチンの方法によって同定される。次いで、これらの分子は、ドッキングのための吸着体上でインビトロおよびインサイチュで転写および翻訳される。例えば、複数の吸着体スポットを有する脱離スペクトロメトリーのための基材が調製される。この基材は、円柱管に重畳され、それによってウェルの底に吸着体を有するウェルを作製する。ウェルにおいて、分化発現したmRNA（通常は、cDNAの形態）のインビトロ転写および翻訳のための試薬を置く。（方法については、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning—A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1989)、およびCurrent Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubelら編 (Current Protocols, Greene Publishing Associates Inc.およびJohn Wiley & Sons, Incとの間の共同投機)を参照のこと）。mRNAまたはESTの翻訳は、吸着されるポリペプチドを産生する。円柱管が除去され、そして、ポリペプチド被分析物を保持する選択条件を同定するように、吸着体スポットは、溶離物で洗浄される。

## 2. 提示ライブラリーを提供する工程

第2の工程は、提示ライブラリーを提供する工程を包含する。提示ライブラリーは、ペプチドの組合せ的なライブラリー（「ポリペプチド物質」）の任意の分類を、その表面上で提示する、遺伝子パッケージから構成される。しかし、単鎖抗体は、その後のイムノアッセイに使用され得るので、魅力的である。

多くの種類の提示ライブラリーおよびその使用は、当該技術分野で公知である。提示方法の基礎概念は、スクリーニングされるべきポリペプチドリガンドと、ポリペプチドをコードする回収可能なポリヌクレオチドとの間の物理的会合の確立である。この物理的会合は、マルチマー分子複合体によって提供され、この場合、遺伝子パッケージ、例えば、ファージ粒子は、ポリペプチドをコードするファージゲノムを封入するキャプシドの一部としてポリペプチドを提示する。ポリペプチドとその遺伝物質との間の物理的会合の確立は、異なるポリペプチドを有

する非常に多数の遺伝子パッケージの同時質量スクリーニングを可能にする。標的への親和性を有するポリペプチドを提示する遺伝子パッケージは、標的に結合し、そしてこれらのパッケージは、標的へのアフィニティスクリーニングによって富化される。これらのパッケージから提示されるポリペプチドの同一性は、それぞれのゲノムから決定され得る。これらの方法を使用して、所望の標的についての結合親和性を有すると同定されたポリペプチドは、次いで、従来の手段によってバルクで合成され得る。

提示ライブラリーに最も頻繁に使用される遺伝子パッケージは、バクテリオファージ、特に線状ファージ、および特にファージM13、Fd、およびF1である。ほとんどの研究は、融合タンパク質を形成するこれらのファージのgIIIまたはgVII Iのいずれかに、提示されるべきポリペプチドをコードするライブラリーを挿入した。例えば、Dower, WO 91/19818; Devlin, WO 91/18989; MacCafferty, WO 92/01047 (遺伝子VIII) ; Huse, WO92/06204; Kang, WO92/18619 (遺伝子VIII) を参照のこと。Gwirlaら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6378-6382(1990); Devlinら, Science 249,404-406(1990); ScottおよびSmith, Science 249, 386-388(1990); Ladnerら, 米国特許第5,223,409号; およびLadnerら, 米国特許5,571,698も参照のこと。このような融合タンパク質は、通常はファージコートタンパク質以外の分泌されるタンパク質からのシグナル配列、提示されるべき

ポリペプチド、および遺伝子IIIまたは遺伝子VIIIのタンパク質またはそのフラグメントのいずれかを含む。外因性コード配列は、しばしば、遺伝子IIIまたは遺伝子VIIIのN末端にまたはその近くに挿入されるが、他の挿入部位が可能である。いくつかのフィラメント状ファージベクターは、遺伝子IIIまたは遺伝子VII Iのいずれかの第2のコピーを産生するように操作されている。このようなベクターでは、外因性配列は、2つのコピーの1つのみに挿入される。他のコピーの発現は、ファージ粒子に組み込まれる融合タンパク質の比率を効果的に希釈し、そしてファージ増殖に有害なポリペプチドに対する選択を減少させることに有利であり得る。細菌(バクテリオファージまたはファージ)を感染させるウイルスの表面上の抗体フラグメントの提示は、広い範囲の親和性および動力学的特徴を

有するヒトSFVを産生することを可能にする。

他の変更では、外因性ポリペプチド配列は、ファージコートタンパク質およびファージパッケージング配列をコードするが複製し得ないファージミドベクターにクローニングされる。ファージミドは、細胞にトランスフェクトされ、そしてヘルパーファージでの感染によってパッケージされる。ファージミド系の使用はまた、コートタンパク質から形成される融合タンパク質を希釈する効果を有し、そしてヘルパーファージから発現されるコートタンパク質の野生型コピーを有するポリペプチドを提示した。例えば、Garrard, WO 92/09690を参照のこと。

真核生物ウイルスは、類似の様式でポリペプチドを提示するために使用され得る。例えば、モロニーマウス白血病ウイルスのgp70に融合したヒトヘレグリンの提示は、Hanら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 9747-9751(1995)によって報告されている。胞子はまた、複製可能な遺伝子パッケージとして使用され得る。この場合、ポリペプチドは、胞子の外表面から提示される。例えば、*B. subtilis*からの胞子は、適切であると報告されている。これらの胞子のコートタンパク質の配列は、Donovanら, J. Mol. Biol. 196, 1-10(1987)によって提供される。

細胞はまた、複製可能な遺伝子パッケージとして使用され得る。提示されるべきポリペプチドは、細胞表面で発現される細胞タンパク質をコードする遺伝子に挿入される。*Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio Cholerae*, *Klebsiella pneumonia*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Nei*

*sseria meningitidis*, *Bacteroides nodosus*, *Moraxella bovis*, および特に *Escherichia coli* を含む細菌細胞が好ましい。外表面タンパク質の詳細は、Ladnerら, 米国特許5,571,698, およびGeorgiouら, Nature Biotechnology 15, 29-34(1997), およびそこに引用される参考文献によって議論される。例えば、*E. coli* の  $\lambda$ MBタンパク質が適切である。

### 3. 提示ライブラリーをスクリーニングする工程

第3の工程は、標的を特異的に結合するリガンドを同定するために提示ライブラリーをスクリーニングする工程を包含する。標的を有する基材は、ポリペプチドと標的分子との間の特異的結合に適切な溶離条件下で、ポリペプチド物質を提

示する提示ライブラリーに曝露される。標的を認識する物質を有する遺伝子パッケージは、基材に既に付着された標的に結合する。結合していない粒子を除去することおよび結合した粒子の保持によって、溶離条件への曝露を得る。

このM13ファージの場合、1 mL当たり約 $10^{11}$  プラーク形成単位 (pfu) を示す、遺伝子パッケージの集団は、結合した標的吸着体 (例えば、タンパク質) のアドレス可能なアレイとともに基材に導入される。接触の際、標的吸着体について最適化される選択条件 (すなわち、選択閾値改変剤または溶離物) が選択され、そのため、総ファージ遺伝子型の小サブセットのみが、選択的に保持され、好ましくは5~10より小さい。結合していないファージ (すなわち、標的吸着体に結合しないファージ) および標的吸着体に緩く結合したファージは、ほとんどの選択的被分析物-標的吸着体相互作用以外のすべてを中断させる溶離物への曝露によって排除されることに注目されたい。標的吸着体への最も高い親和性を有するファージ提示ポリペプチドは、選択的に保持される。

4. 標的を特異的に結合する物質を含む結合した遺伝子パッケージを検出する工程

第4の工程では、遺伝子パッケージの標的への結合は、脱離スペクトロメトリーによって検出される。例えば、M13ファージは、単一のコートタンパク質の数千のコピーを有する。脱離スペクトロメトリーにおいてレーザーでファージを打

つ際に、コートタンパク質は除去され、そして検出可能である。このように、ライブラリーが、標的に結合した物質を有するファージを含むかどうかを決定し得る。その後の分析について遺伝子パッケージを得るために、スクリーニング工程は、プローブについて異なる位置で並行に行い得、または基材は、レーザーが表面に結合した遺伝子パッケージすべてを除去しないように十分に大きな物理学的次元を有し得る。この方法は、被分析物に結合した少数のファージでさえ検出され得るので、特に強力である。

M13の場合に、好ましい検出方法は、脱離スペクトロメトリーによって、「マーカ-」タンパク質シグナルとして遺伝子VIIIコートタンパク質の出現をモニターすることである。この様式では、結合した5ファージ粒子 (pfu) (既知の希



釈物からの算出によって推定されるファージ粒子数) くらい少ない「陽性」標的吸着体を検出した。好ましさの順で、他のファージマーカーには、遺伝子V、遺伝子X、および遺伝子III (それらの融合産物を含む) が含まれる。

最高の親和性吸着体との吸着体位置、すなわち、高い選択条件 (すなわち、ストリンジェント溶離物) への曝露後に保持される最少のファージとのアレイ内の位置の検出後、結合したパッケージは、現在、他の使用のための出発点 (jump-off point) として使用され得る。

#### 5. 遺伝子パッケージを単離する工程

1つの実施態様では、この方法は、さらなる分析のために遺伝子パッケージを単離する工程をさらに包含する。この分析は、遺伝子パッケージを再生する工程、およびそれからポリヌクレオチドを単離する工程を包含し得る。単離されたファージは、通常の方法によって再生される。例えば、保持されたファージは、その後の分析のための遺伝子パッケージを増殖させるために、生物学的増幅ビヒクル、例えば、*E. coli* および栄養培地に曝露され得る。単一クローンは、基材に保持される被分析物に結合する能力についてさらに試験され得る。

#### 6. ポリペプチド物質をコードするヌクレオチド配列を配列決定する工程

結合した遺伝子パッケージのポリペプチド物質をコードするヌクレオチド配列

を配列決定する工程は、ポリペプチド物質を産生するための情報を提供する。配列決定は、吸着体から遺伝子パッケージを単離する工程、それを再生する工程、ポリヌクレオチドを単離する工程、および任意の利用可能な手段によってヌクレオチド配列を配列決定する工程を包含し得る。別の方法では、遺伝子パッケージは、基材を、遺伝子パッケージによって感染を受ける細胞のような適切な材料と接触させる工程によって、インサイチュで再生され得る。別の実施態様では、配列決定は、インサイチュで行われる。この方法は、遺伝子パッケージを溶解する工程、および任意の公知の手段、例えば、PCRによってヌクレオチド配列を増幅する工程を包含し得る。いくつかの異なる遺伝子パッケージは、表面で利用可能な異なるエピトープに結合し得る。この場合には、ある種のみのファージがエピトープに結合するように溶離条件を変更し得る。

## 7. ポリペプチド物質を産生する工程

1つの価値のある次の工程は、ポリペプチド物質を産生する工程を包含する。単離された物質は、例えば、診断における標的の特異的検出のための、またはリガンド／レセプター相互作用の研究のための、吸着体として使用され得る。

1つの方法では、ポリペプチドを産生する工程は、最初に、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を配列決定する工程を包含する。アミノ酸配列は、ヌクレオチド配列に由来し得る。配列決定は、上記のような方法によって達成され得る。配列は、ポリペプチド物質の組換えまたは化学合成に基づき得る。

別の方法では、ポリペプチドは、遺伝子パッケージを再生することによって産生され得る。これは、遺伝子パッケージがポリペプチド物質の多くのコピーを含む場合、特に効果的である。遺伝子パッケージは、インサイチュでまたは単離後に再生され得る。

ポリペプチドを組換え産生する方法は、以下のように行い得る。ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、配列決定されるか、または議論されるような任意の手段によって単離されるかのいずれかである。次いで、ヌクレオチド配列は、発現ベクターに含まれる。発現ベクターは、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結される発現制御配列を含む。次いで、発現ベク

ターは、当該技術分野で周知の手段によって、ポリペプチド物質を組換え発現するために使用され得る。

標的が1つより多くのエピトープを含み得ることが理解される。したがって、この方法は、標的に特異的な1つより多くのポリペプチド物質を産生し得る。

次いで、標的特異的物質は、臨床診断または薬物発見に使用されるブロープのための吸着体として使用され得る。すなわち、このようなブロープが、標的を特異的に結合する物質をその表面上に含むので、これらは、生物学的試料のような複合混合物から標的を単離するために、および脱離スペクトロメトリーによって標的を検出するために使用され得る。さらに、物質と標的との間の相互作用が、生体特異的であり得るので、上記の進行的分離方法によって展開される吸着体よりも2つの間により大きい親和性を含む確率が高い。

## 8. 標的のペプチドエпитーブを単離する工程

1つの型では、この方法は、標的被分析物のペプチドエпитーブを単離することを可能にする。この方法は、「抗イディオ型」様アプローチを用いる。まとめると、標的被分析物のエпитーブは、例えば、ファージ提示ライブラリーでスクリーニングされる。単離されたファージは、例えば、被分析物のエпитーブを認識する単鎖抗体を含む。これらのファージは、次に、第2の提示ライブラリーをスクリーニングするために使用される。第1の単鎖抗体に結合する第2のライブラリーからのファージは、単鎖抗体によって認識されるエпитーブの構造を模倣する提示されたポリペプチドを含む。

この方法の1つの実施態様では、標的被分析物を結合するポリペプチド物質をコードするヌクレオチド配列は、物質が遺伝子VIIIとの融合物として提示されるML3ファージを産生するために使用される。したがって、このファージは、その表面上に標的ペプチドの数百のコピーとともにコートを有する。このファージは、次いで、吸着体にドッキングされる。ドッキングは、例えば、遺伝子IIIを結合するリガンドによって達成され得、または遺伝子IIIは、基材上のリガンドについてのレセプターを含むように改変され得る。次いで、ファージは、第2の提示ライブラリーに曝露される。ドッキングしたファージに結合するライブラリーか

らの遺伝子パッケージは、検出され、そして記載のように単離される。好ましくは、第2の提示ライブラリーは、その遺伝子VIIIタンパク質が基材にドッキングしたファージの遺伝子VIIIと区別され得るように、いくつかの分類の質量(mass)標識を含む。したがって、「被分析物標的」としてまたは吸着体としての物質の同定は、結合した物質が、その後、別の物質を結合するために使用されるかどうかに依存し得る。わかり得るように、既にドッキングした物質に物質を結合する能力は、最後に結合した物質を選択的に除去する条件を同定する方法であり得るので、持続し得る。

## 実施例

以下の実施例は、例示の手段によって提供されるが、限定の手段によって提供

されない。

以下の実施例において、以下の製品および用語が用いられる。ニワトリ卵白リゾチーム ( $10 \mu\text{mol}/\mu\text{l}$  水に希釈される  $1 \mu\text{l}$ ) は、Sigma Chemical Company, St. Louis, MOから利用可能である。「ヒト血清」は、20mM リン酸ナトリウム緩衝液、0.5M NaCl、pH7.0中に1:5に希釈されたヒト血清の  $1 \mu\text{l}$  の組成物という。

本明細書中で使用されるように、「mg」は、ミリグラムを意味し；「ml」は、ミリリットルを意味し；「 $\mu\text{l}$ 」は、マイクロリットルを意味し；「cm」はセンチメートルを意味し；「nm」は、ナノメートルを意味し；「M」は、モルを意味し；「mM」は、ミリモルを意味し；「min」は、分を意味し；「%」あるいは「パーセント」は、他で詳述しない限り重量パーセントであり；「NaCl」は、塩化ナトリウムを意味し；「TFA」は、トリフルオロ酢酸を意味する。

#### I. 被保持物クロマトグラフィーについてのプロトコル

以下のプロトコルは、被保持物クロマトグラフィーを行うための手順の例である。

A. 被保持物マッピングについてのプロトコル (クロマトグラフィー連続アレイを使用する)

##### 1. 試料処理

HEPESまたは20mMリン酸ナトリウム、pH7.2中の0.01% Triton X100に、生物学的試料 (例えば、血清、尿、細胞抽出物、または細胞培養培地) を希釈する。必要であれば、試料を澄清化するために遠心分離する。

##### 2. 試料適用

アニオン性、通常相、またはTED-Cu(II)吸着体アレイのスポットに、試料 ( $1 \sim 5 \mu\text{l}$ ) を添加する。疎水性の吸着体アレイについて、0.5% TFAを含有する  $0.5 \mu\text{l}$  アセトニトリルで、各スポットを予め湿潤する。アセトニトリルが乾燥する前に、スポットに試料を添加する。試料をスポット上で (ほとんど乾燥まで) 濃縮させる。

##### 3. 洗浄

## a. アニオン性の吸着体アレイ

スポット1を、20mM HEPESまたはリン酸ナトリウム、pH7.2で洗浄する。試料が完全に乾燥する前に、スポットに、最初の $2\mu\text{l}$ の洗浄溶液を添加する。洗浄溶液を、少なくとも15秒間、スポット上に置かせる。ピペットで10回出し入れする。最初の洗浄を完全に除去し、 $2\mu\text{l}$ の溶液の第2洗浄を用いて反復する。

上述のように、20mMリン酸ナトリウム、pH7.2中の0.2M NaClでスポット2を洗浄する。

上述のように、20mMリン酸ナトリウム、pH7.2中の1M NaClでスポット3を洗浄する。

上述のように、20mM Tris HCl、pH8.5で、スポット4を洗浄する。

上述のように、0.1M酢酸ナトリウム、pH4.5で、スポット5を洗浄する。

上述のように、20mM HEPESまたはリン酸ナトリウム、pH7.2中の0.05% Triton X100で、スポット6を洗浄する。

上述のように、20mM HEPESまたはリン酸ナトリウム、pH7.2中の3M尿素で、スポット7を洗浄する。

上述のように、水中の10%アセトニトリルで、スポット8を洗浄する。

水で、徹底的に、全アレイを洗浄する。

チップを風乾する。

$0.3\mu\text{l}$ のEnergy Absorbing Molecule (50%アセトニトリル、0.5%トリフルオロ

酢酸中に調製された飽和化溶液)を添加する。

チップを風乾する。

レーザー脱着/イオン化時間のフライト質量分析器で、各スポット上に保持されたタンパク質を分析する。

## b. 通常相の吸着体アレイ

スポット1を、5mM HEPES、pH7で洗浄する。試料が完全に乾燥する前に、スポットに、最初の $2\mu\text{l}$ の洗浄溶液を添加する。洗浄溶液を、少なくとも15秒間、スポット上に置く。ピペットで10回、出し入れする。最初の洗浄を完全に除去

し、 $2\mu\text{l}$ の溶液の第2洗浄を用いて反復する。

上述のように、 $20\text{mM}$ リン酸ナトリウム、 $0.15\text{M}$   $\text{NaCl}$ 、 $\text{pH}7.2$ でスポット2を洗浄する。

上述のように、 $20\text{mM}$ リン酸ナトリウム、 $0.5\text{M}$   $\text{NaCl}$ 、 $\text{pH}7.2$ でスポット3を洗浄する。

上述のように、 $0.1\text{M}$ 酢酸ナトリウム、 $\text{pH}4.0$ で、スポット4を洗浄する。

上述のように、 $20\text{mM}$ リン酸ナトリウム、 $0.15\text{M}$   $\text{NaCl}$ 、 $\text{pH}7.2$ 中で $0.05\%$  TritonX 100にて、スポット5を洗浄する。

上述のように、 $20\text{mM}$ リン酸ナトリウム、 $0.15\text{M}$   $\text{NaCl}$ 、 $\text{pH}7.2$ 中で $3\text{M}$ 尿素にて、スポット6を洗浄する。

上述のように、 $1\%$  TFAでスポット7を洗浄する。

上述のように、水中の $30\%$ イソプロパノール：アセトニトリル（ $1:2$ ）で、スポット8を洗浄する。

水で、徹底的に、全アレイを洗浄する。

チップを風乾する。

$0.3\mu\text{l}$ のEnergy Absorbing Molecule（ $50\%$ アセトニトリル、 $0.5\%$ トリフルオロ酢酸中に調製された飽和化溶液）を添加する。

チップを風乾する。

レーザー脱着／イオン化時間のフライト質量分析器で、各スポット上に保持されたタンパク質を分析する。

### c. TED-Cu(II)吸着アレイ

スポット1を、 $20\text{mM}$ リン酸ナトリウム、 $0.5\text{M}$   $\text{NaCl}$ 、 $\text{pH}7.2$ で洗浄する。試料が完全に乾燥する前に、スポットに、最初の $2\mu\text{l}$ の洗浄溶液を添加する。洗浄溶液を、少なくとも $15$ 秒間、スポット上に置かせる。ピペットで、 $10$ 回出し入れする。最初の洗浄を完全に除去し、 $2\mu\text{l}$ の溶液の第2洗浄を用いて反復する。

上述のように、 $20\text{mM}$ リン酸ナトリウム、 $0.5\text{M}$   $\text{NaCl}$ 、 $\text{pH}7.2$ 中の $20\text{mM}$ イミダゾールでスポット2を洗浄する。

上述のように、 $20\text{mM}$ リン酸ナトリウム、 $0.5\text{M}$   $\text{NaCl}$ 、 $\text{pH}7.2$ 中の $100\text{mM}$ イミダゾ

ールでスポット3を洗浄する。

上述のように、0.1M酢酸ナトリウム、0.5M NaCl、pH4.0で、スポット4を洗浄する。

上述のように、20mMリン酸ナトリウム、0.15M NaCl、pH7.2中の0.05% Triton X100で、スポット5を洗浄する。

上述のように、20mMリン酸ナトリウム、0.15M NaCl、pH7.2中の3M尿素で、スポット6を洗浄する。

上述のように、1% TFAでスポット7を洗浄する。

上述のように、水中の10%アセトニトリルで、スポット8を洗浄する。

水で、徹底的に、全アレイを洗浄する。

チップを風乾する。

0.3  $\mu$  lのEnergy Absorbing Molecule (50%アセトニトリル、0.5%トリフルオロ酢酸中に調製された飽和化溶液)を添加する。

チップを風乾する。

レーザー脱着/イオン化時間のフライト質量分析器で、各スポット上に保持されたタンパク質を分析する。

#### d. 疎水性の吸着体アレイ

スポット1を、0.1%TFA中の5%アセトニトリルで洗浄する。試料が完全に乾燥する前に、スポットに、最初の2  $\mu$  lの洗浄溶液を添加する。洗浄溶液を、少

なくとも15秒間、スポット上に置かせる。ピペットで、10回出し入れる。最初の洗浄を完全に除去し、2  $\mu$  lの溶液の第2洗浄を用いて反復する。

上述のように、0.1%TFA中の50%アセトニトリルでスポット2を洗浄する。

上述のように、20mMリン酸ナトリウム、0.15M NaCl、pH7.2中の0.05% Triton X100でスポット3を洗浄する。

上述のように、20mMリン酸ナトリウム、0.15M NaCl、pH7.2中の3M尿素で、スポット4を洗浄する。

水で、徹底的に、全アレイを洗浄する。

チップを風乾する。

0.3  $\mu$  l の Energy Absorbing Molecule (50%アセトニトリル、0.5%トリフルオロ酢酸中に調製された飽和化溶液) を添加する。

チップを風乾する。

レーザー脱着/イオン化時間のフライト質量分析器で、各スポット上に保持されたタンパク質を分析する。

B. 抗体-抗原アッセイ: レセプターリガンドアッセイについてのプロトコル (予め活性化された吸着体アレイを使用する)

#### 1. 予め活性化された吸着体アレイ上への抗体の固定

平らで清潔な表面に予め活性化した吸着体アレイを置く。0.5  $\mu$  l のイソプロパノールで予め湿潤された予め活性化された吸着体アレイの各スポット上に、抗体またはレセプターまたはコントロールの溶液をスポットする (イソプロパノールが乾燥する前に、1  $\mu$  l の抗体/スポットを添加する)。

加湿チャンバーにおいてインキュベートする (4℃または室温、2~18時間)

。

ピペットを使用して、スポットから、残余の溶液を除去する。

PBS中の1 mlの1 Mエタノールアミン、pH7.4を、全体のチップにわたって添加することによって、スポット上の残余の活性部位をブロックし、そして加湿チャンバーにおいてインキュベートする (室温、30分間)。

PBS中の1% Triton X-100で、チップを2回洗浄する。15 ml のコニカルプラスチックチューブにおいて、約9 mlの洗浄溶液中にチップを沈め、そして少なくとも

も約15分間、卓上振とう器上で振動する。

上述のように、0.1M酢酸ナトリウム、pH4.0中の0.5M NaClで洗浄する。

上述のように、0.1M TrisHCl、pH8.0中の0.5M NaClで洗浄する。

上述のようにPBSでリンスする。次いで、PBSでチップを覆い、そして使用する準備ができるまで、4℃で保存する。

#### 2. 抗原またはリガンドの結合

穏やかに浸透するか、またはチップ上のPBSを吸い取る

各スポットに1~5  $\mu$  l の試料を添加する。非常に低い抗原またはリガンドの



濃度を有する試料について、バイオプロセッサー中に吸着体アレイを置く。200  $\mu$  l PBSで、2回、チップ上のスポットおよびバイオプロセッサーウェルを洗浄する。最大300  $\mu$  lの試料を、各ウェルに添加する。

接着性テープでシールする。

浸透しながら、インキュベートする（4℃または室温、1～18時間）。

### 3. 洗浄

スポットから試料を取り出し、2  $\mu$  lの、PBS中の0.1%Triton X100(pH7.2)で各スポットを2回洗浄する。最初の2  $\mu$  lの洗浄溶液を、スポットに添加する。洗浄溶液を、少なくとも15秒間、スポット上に置かせる。ピペットで、10回出し入れする。最初の洗浄を完全に除去し、2  $\mu$  lの溶液の第2の洗浄を用いて反復する。この後、0.1M HEPES、pH7.4中の0.5M NaClで洗浄した。

水で、徹底的に、全アレイを洗浄する。

### 4. 保持されたタンパク質の分析

チップを風乾する。

0.3  $\mu$  lのEnergy Absorbing Molecule (50%アセトニトリル、0.5%トリフルオロ酢酸中に調製されたシナピン酸 (sinapinic acid) またはFAMIまたはCHCAの飽和溶液) を添加する。

チップを風乾する。

レーザー脱着/イオン化時間のフライト質量分析器で、各スポット上に保持されたタンパク質を分析する。

## II. リゾチーム認識プロファイル

本発明者らは、高情報分別度の被保持物クロマトグラフィーを使用して、リゾチームについて認識プロファイルを作製した。プロファイルは、それぞれ、多様な異なる選択性閾値調節物下の、6つの吸着体でのリゾチームの分別を含む。結果は、リゾチームの物理化学プロファイルを、異なって特徴付ける40個の異なるスペクトルグラフである。

A・親水性吸着体アレイを使用する、リゾチーム認識プロファイル

ニワトリ卵白リゾチームを、ステンレススチール基材上の酸化ケイ素吸着体の

クロマトグラフィー連続吸着体アレイの種々のスポットに添加する。室温にて、15分間、加温チャンバーにおけるインキュベーション後、吸着体の各異なるスポットを、以下の溶離物（選択性閾値調節物）の1つで洗浄する：

- (1) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0、
- (2) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0中の0.2M NaCl、
- (3) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0中の0.4M NaCl、
- (4) 25mM酢酸ナトリウム緩衝液、0.125M NaCl、pH4.5、
- (5) 1% TFA、
- (6) 水中の10%アセトニトリル、
- (7) 水中の20%アセトニトリル、
- (8) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、0.15M NaCl、pH7.0中の0.05% Tween20、および
- (9) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0中の3M尿素。

各洗浄は、吸着体のスポットを、3回、1  $\mu$  lの洗浄溶液でピペッティングする工程を包含する。このプロセスは、洗浄溶液の新鮮なアリコートを用いて反復する。その後、吸着体のスポットを、1  $\mu$  lの水で2回洗浄する。シナピン酸の0.3  $\mu$  lのアリコート (5mg/ml 50%アセトニトリル：0.5% TFA) を添加し、そして

風乾させる。アレイを、窒素レーザー (355nm) および60cmフライトチューブを使用して、質量分析器で分析する。データを、コンピューターによって分析し、そしてデータオーバーレイ表示について、GRAMS/32c (Galactic Industries Corporationから利用可能) にエクスポートする。

図5Aは、通常相のクロマトグラフィー連続吸着体アレイに対するリゾチーム認識プロファイルの合成マスペクトルを示す。下部のプロファイルは、pH7緩衝液単独での洗浄後の、酸化ケイ素吸着体に保持されたリゾチームシグナル強度を示す。選択性閾値調節物中の塩化ナトリウム (0.2~0.4M) の包含は、リゾチームの保持を減少する。これは、酸化ケイ素 (pH7で負に荷電される) 吸着体とリゾチーム (塩基性タンパク質) との相互作用が、イオン交換機構を含むことを

示す。選択性閾値調節物のpHを、例えば、酢酸ナトリウム緩衝液中でpH4.5に、または1% TFA中で2未満に低下すると、酸化ケイ素吸着体における負電荷をほとんど完全に排除し、そしてリゾチームは、もはや保持されない。選択性閾値調節物中に、極性調節化剤（例えば、有機溶媒（例えば、アセトニトリル）、または界面活性剤（例えば、Tween20）、または尿素を包含することはまた、シリコーン酸化吸着体とリゾチームとの相互作用を減少する。このことは、他の相互作用機構が、親水性相互作用を含むことを示す。

B. 疎水性吸着体アレイを使用するリゾチーム認識プロファイル

ニワトリ卵白リゾチームを、酸化ケイ素でコートされたステンレススチール基材上にコートされたポリプロピレン（C<sub>3</sub>疎水性）吸着体のクロマトグラフィー連続吸着体アレイの種々のスポットに添加する。室温で、15分間、加湿チャンバーにおけるインキュベーション後、吸着体の各異なるスポットを、以下の溶離物（選択性閾値調節物）の1つで洗浄する：

- (1) 0.1% TFA、
- (2) 0.1% TFA中の10%アセトニトリル、
- (3) 0.1% TFA中の20%アセトニトリル
- (4) 0.1% TFA中の50%アセトニトリル
- (5) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、0.15M NaCl、pH7.0、中の0.05% Tween20、

および

- (6) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、0.15M NaCl、pH7.0中の3M尿素。

各洗浄は、吸着体のスポットの内外を、3回、1  $\mu$  lの洗浄溶液でピペティングする工程を包含する。このプロセスは、洗浄溶液の新鮮なアリコートを用いて反復する。その後、吸着体のスポットを、1  $\mu$  lの水で2回洗浄する。シナビン酸の0.3  $\mu$  lのアリコート（5 mg/ml 50%アセトニトリル：0.5%TFA）を添加し、そして風乾させる。アレイを、窒素レーザー（355nm）および60cmフライトチューブを使用して、質量分析器で分析する。データを、コンピューターによって分析し、そしてデータオーバーレイ表示について、GRAMS/32cにエクスポートする。

図5Bは、疎水性C<sub>3</sub>クロマトグラフィー連続吸着体アレイに対するリゾチーム認識プロファイルの合成マスペクトルを示す。下部のプロファイルは、0.1% TFA単独での洗浄後の、疎水性C<sub>3</sub>吸着体に保持されたリゾチームシグナル強度を示す。選択性閾値調節物中の極性調節化剤（例えば、アセトニトリル）の包含は、疎水性C<sub>3</sub>吸着体におけるリゾチームの保持を減少する。疎水性C<sub>3</sub>吸着体からのリゾチームの溶出についてのアセトニトリル濃度の範囲は、20~50%の間である。選択性閾値調節物中の、界面活性剤（Tween20）、または尿素の包含は、疎水性C<sub>3</sub>吸着体におけるリゾチームの保持を有意には減少しない。

#### C. フェニル疎水性吸着体アレイを使用するリゾチーム認識プロファイル

ニワトリ卵白リゾチームを、酸化ケイ素でコートされたステンレススチール基材上にコートされたポリスチレン（フェニル疎水性）吸着体の吸着体アレイの種々のスポットに添加する。室温で、15分間、加湿チャンバーにおけるインキュベーション後、吸着体の1つのスポットを、以下の溶離物（選択性閾値調節物）の1つで洗浄する：

- (1) 0.1% TFA、
- (2) 0.1% TFA中の10%アセトニトリル、
- (3) 0.1% TFA中の20%アセトニトリル
- (4) 0.1%TFA中の50%アセトニトリル
- (5) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、0.15M NaCl、pH7.0、中の0.05% Tween20

および

- (6) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、0.15M NaCl、pH7.0中の3M尿素。

各洗浄は、吸着体のスポットの内外を、3回、1  $\mu$  lの洗浄溶液でピペッティングする工程を包含する。このプロセスは、洗浄溶液の新鮮なアリコートを用いて反復する。その後、吸着体のスポットを、1  $\mu$  lの水で2回洗浄する。シナピン酸の0.3  $\mu$  lのアリコート（5 mg/ml 50%アセトニトリル：0.5% TFA）を添加し、そして風乾させる。アレイを、窒素レーザー（355nm）および60cmフライトチューブを使用して、質量分析器で分析する。データを、コンピューターによって

分析し、そしてデータオーバーレイ表示について、GRAMS/32cにエクスポートする。

図5Cは、疎水性フェニクロマトグラフィー連続吸着体アレイに対するリゾチーム認識プロファイルの合成マスペクトルを示す。下部のプロファイルは、0.1%TFA単独での洗浄後の、疎水性フェニル吸着体に保持されたリゾチームシグナル強度を示す。選択性閾値調節物中の極性調節化剤（例えば、アセトニトリル）の包含は、リゾチームの保持を減少する。疎水性C<sub>3</sub>吸着体からのリゾチームの溶出についてのアセトニトリル濃度の範囲は、20~50%の間であるが、C<sub>3</sub>およびフェニル表面に対して保持されるリゾチームピーク強度を、同じ20%アセトニトリル洗浄条件下で比較する場合、フェニル吸着体とのリゾチームの相互作用は、あまり強力ではない。選択性閾値調節物中の、界面活性剤（例えば、Tween20）または尿素の包含はまた、疎水性フェニル吸着体におけるリゾチームの保持を有意に減少する。

D. アニオン性吸着体アレイを使用するリゾチーム認識プロファイル

ニワトリ卵白リゾチームを、酸化ケイ素でコートされたステンレススチール基板上にコートされたアニオン基（SO<sub>3</sub><sup>-</sup>）吸着体（すなわち、カチオン性交換吸着体）の吸着体アレイの種々のスポットに添加する。室温で、15分間、加湿チャンパーにおけるインキュベーション後、吸着体の各異なるスポットを、以下の溶離物（選択性閾値調節物）の1つで洗浄する：

- (1) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0、
- (2) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0中の0.1M NaCl、
- (3) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0中の0.2M NaCl、
- (4) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0中の0.4M NaCl、
- (5) 25mM酢酸ナトリウム緩衝液、0.125M NaCl、pH4.5、
- (6) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、0.15M NaCl、pH7.0中の0.05% Tween20、および
- (7) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0中の3M尿素。

各洗浄は、吸着体のスポットの内外を、3回、1μlの洗浄溶液でピペットイ

ングする工程を包含する。このプロセスを、洗浄溶液の新鮮なアリコートを用いて反復する。その後、吸着体のスポットを、1  $\mu$  lの水で2回洗浄する。シナビン酸の0.3  $\mu$  lのアリコート (5 mg/ml 50%アセトニトリル:0.5% TFA) を添加し、そして風乾させる。アレイを、窒素レーザー (355nm) および60cmフライトチューブを使用して、質量分析器で分析する。データを、コンピュータによって分析し、そしてデータオーバーレイ表示のために、GRAMS/32cにエクスポートする。

図5Dは、カチオン交換クロマトグラフィー連続アレイに対するリゾチーム認識プロファイルの合成マスペクトルを示す。下部のプロファイルは、pH7の緩衝液単独での洗浄後の、アニオン性吸着体に保持されたリゾチームシグナル強度を示す。選択性閾値調節物中の漸増濃度の塩化ナトリウム (0.1~0.4M) の包含は、リゾチームの保持を減少する。これは、アニオン性吸着体とリゾチーム (塩基性タンパク質) との相互作用が、イオン交換機構を含むことを示す。0.4M NaCl濃度が、リゾチームを溶出するために必要とされる。選択性閾値調節物のpHを、酢酸ナトリウム緩衝液中でpH4.5に低下することは、強力なアニオン性吸着体におけるリゾチームの保持に影響しない。選択性閾値調節物中に、極性調節剤 (例えば、界面活性剤 (例えば、Tween20) 、または尿素) を包含することと、アニオン性吸着体とリゾチームとの相互作用が減少する。このことは、アニオン性吸着体と疎水性リゾチームタンパク質との相互作用が、溶離物の極性によって調節されることを示す。

E. カチオン性吸着体アレイを使用するリゾチーム認識プロファイル

ニワトリ卵白リゾチームを、酸化ケイ素でコートされたステンレススチール基

板上にコートされたカチオン性 (第4級アミン) 吸着体の吸着体アレイの種々のスポットに添加する。室温で、15分間、加湿チャンバーにおけるインキュベーション後、吸着体の各異なるスポットを、以下の溶離物 (選択性閾値調節物) の1つで洗浄する:

- (1) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0、
- (2) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0中の0.1M NaCl、

- (3) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0中の0.2M NaCl、
- (4) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0中の0.4M NaCl、
- (5) 25mM酢酸ナトリウム緩衝液、0.125M NaCl、pH4.5、
- (6) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、0.15M NaCl、pH7.0中の0.05% Tween20、または
- (7) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0中の3M尿素。

各洗浄は、吸着体のスポットを、3回、1 $\mu$ lの洗浄溶液でピベッティングする工程を包含する。このプロセスは、洗浄溶液の新鮮なアリコートを用いて反復する。その後、吸着体のスポットを、1 $\mu$ lの水で2回洗浄する。シナビン酸の0.3 $\mu$ lのアリコート (5 mg/ml 50%アセトニトリル:0.5% TFA) を添加し、そして風乾させる。アレイを、窒素レーザー (355nm) および60cmフライトチューブを使用して、質量分析器で分析する。データを、コンピューターによって分析し、そしてデータオーバーレイ表示のために、GRAMS/32cにエクスポートする。

図5Eは、カチオン性 (アニオン交換) 吸着体クロマトグラフィー連続吸着体アレイに対するリゾチーム認識プロファイルの合成マスマスペクトルを示す。カチオン性吸着体における塩基性リゾチームタンパク質の保持は非常に弱い。リゾチーム保持に対する選択性閾値調節物を調節する効果は、極小さい。

F. 固定化された金属イオン吸着体アレイを使用するリゾチーム認識プロファイル

ニワトリ卵白リゾチームを、酸化ケイ素でコートされたステンレススチール基材上にコートされた固定化金属 (イミノジアセテート-Cu) 吸着体の吸着体アレイの種々のスポットに添加する。室温で、15分間、加湿チャンバーにおけるイン

キュベーション後、吸着体の各異なるスポットを、以下の溶離物 (選択性閾値調節物) の1つで洗浄する:

- (1) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、0.5M NaCl、pH7.0、
- (2) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、0.5M NaCl、pH7.0中の5mMイミダゾール、
- (3) 0.1M酢酸ナトリウム緩衝液、0.5M NaCl、pH4.5、

(4) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、0.15M NaCl、pH7.0中の0.05% Tween20、または、

(5) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、0.5M NaCl、pH7.0中の3M尿素。

各洗浄は、吸着体のスポットを、3回、1  $\mu$  lの洗浄溶液でビベッティングする工程を包含する。このプロセスは、洗浄溶液の新鮮なアリコートを用いて反復する。その後、吸着体のスポットの内外を、1  $\mu$  lの水で2回洗浄する。シナビン酸の0.3  $\mu$  lのアリコート (5 mg/ml 50%アセトニトリル:0.5%TFA) を添加し、そして風乾させる。アレイを、窒素レーザー (355nm) および60cmフライトチューブを使用して、質量分析器で分析する。データを、コンピューターによって分析し、そしてデータオーバーレイ表示について、GRAMS/32cにエクスポートする。

図5Fは、固定化金属クロマトグラフィー連続吸着体アレイに対するリゾチーム認識プロファイルの合成マスペクトルを示す。下部のプロファイルは、pH7緩衝液単独での洗浄後の固定化銅イオン吸着体に対して保持されるリゾチームシグナル強度を示す。選択性閾値調節物中のヒスチジン結合拮抗性アフィニティーリガンド (例えば、イミダゾール) の包含は、リゾチームの保持を排除する。これは、固定化銅イオン吸着体とリゾチーム (これは、配列中に単一のヒスチジン残基を有する) との相互作用が、配位的な共有結合機構を含むことを示す。選択性閾値調節物のpHを、酢酸ナトリウム緩衝液中でpH4.5に低下することはまた、固定化銅吸着体におけるリゾチームの保持を減少する。これは、配位的な共有結合相互作用を阻害する、リゾチームにおけるヒスチジン残基の水素付加の結果であると考えられる。界面活性剤 (すなわち、Tween20) の包含は、相互作用に影響しない。尿素の包含は、固定化銅吸着体におけるリゾチームの保持を完全に排除する。

### III. ヒト血清中の被分析物の分別能

本発明者らは、多様な吸着体および溶離物を使用して、ヒト血清中の被分析物を分別した。これらの結果は、被分析物が異なる吸着体によって異なって保持されること、ならびに被保持物クロマトグラフィーが、低いおよび高い分子量の両



方で情報を提供し得ることを示す。

#### A. 固定化金属イオン吸着体アレイを使用するヒト血清タンパク質認識プロファイル

ヒト血清を、酸化ケイ素でコートされたステンレススチール基材上にコートされた固定化金属イオン（トリス(カルボキシメチル)エチレンジアミン-Cu）吸着体の吸着体アレイの種々のスポットに添加する。室温で、15分間、加湿チャンバーにおけるインキュベーション後、吸着体の各異なるスポットを、以下の溶離物（選択性閾値調節物）の1つで洗浄する：

- (1) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、0.5M NaCl、pH7.0
- (2) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、0.5M NaCl、pH7.0中の5mMイミダゾール、
- (3) 0.1M酢酸ナトリウム緩衝液、0.5M NaCl、pH4.5、
- (4) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、0.15M NaCl、pH7.0中の0.05% Tween20、および
- (5) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、0.5M NaCl、pH7.0中の3M尿素。

各洗浄は、吸着体のスポットを、3回、1 $\mu$ lの洗浄溶液でピペッティングする工程を包含する。このプロセスは、洗浄溶液の新鮮なアリコートを用いて反復する。その後、吸着体のスポットを、1 $\mu$ lの水で2回洗浄する。シナビン酸の0.3 $\mu$ lのアリコート（5mg/ml 50%アセトニトリル；0.5% TFA）を添加し、そして風乾させる。アレイを、窒素レーザー（355nm）および60cmフライトチューブを使用して、質量分析器で分析する。データを、コンピューターによって分析し、そしてデータオーバーレイ表示について、GRAMS/32Cにエクスポートする。

図6Aおよび6Bは、固定化金属クロマトグラフィー連続吸着体アレイに対する血清タンパク質認識プロファイルの、低いおよび高い分子量での合成マスペクトルを示す。下部のプロファイルは、pH7緩衝液単独での洗浄後の固定化銅吸着体

に保持される血清タンパク質を示す。選択性閾値調節物中のヒスチジン結合拮抗性アフィニティーリガンド（例えば、イミダゾール）、または界面活性剤（例えば、Tween20）、もしくは尿素の包含、または選択性閾値調節物のpHの4.5への低下は、同じ吸着体における複雑なタンパク質混合物の異なる成分の保持を、異な

って増強または減少する。

B. 複数の異なる吸着体を使用する、ヒト血清タンパク質認識プロファイル  
ヒト血清を、以下の異なる吸着体の吸着体アレイの種々のスポットに添加する

:

- (1) C, 疎水性、
- (2) フェニル疎水性
- (3) アニオン交換
- (4) カチオン交換、および
- (5) 固定化金属 (トリス(カルボキシメチル)エチレンジアミン-Cu)。

各吸着体を、酸化ケイ素でコートしたステンレススチール基材上にコートする。  
室温で、15分間、加湿チャンバーにおけるインキュベーション後、吸着体の各  
スポットを、選択性閾値調節物として20mMリン酸ナトリウム緩衝液、0.15M NaCl  
、pH7.0中の0.05% Tween20で洗浄する。

各洗浄は、吸着体のスポットを、3回、1  $\mu$  l の洗浄溶液でピペッティングす  
る工程を包含する。このプロセスは、洗浄溶液の新鮮なアリコートを用いて反復  
する。その後、吸着体のスポットを、1  $\mu$  l の水で2回洗浄する。シナペン酸の  
0.3  $\mu$  l のアリコート (5 mg/ml 50% アセトニトリル : 0.5% TFA) を添加し、そ  
して風乾させる。アレイを、窒素レーザー (355nm) および60cmフライトチュー  
ブを使用して、質量分析器で分析する。データを、コンピューターによって分析  
し、そしてデータオーバーレイ表示について、GRAMS/32cにエクスポートする。

図7Aおよび7Bは、クロマトグラフィー連続吸着体アレイの種々の吸着体  
に対する血清タンパク質認識プロファイルの合成マススペクトルを示す。複数の異  
なる吸着体 (異なる結合特性を有する) に対する単一の選択性閾値調節物の使用

は、異なる吸着体における複雑なタンパク質混合物の異なる成分の保持を、異な  
って増強または減少する。

#### IV. 早生児 (preterm infant) 尿中の被分析物の分離

本発明者らは、様々な吸着体および溶離物を使用して、早生児尿中の被分析物  
を分離した。これらの結果は、吸着体が被分析物を示差的に保持するので、種々

の吸着体の使用が、大きな分離能力を提供することを示す。これらの結果はまた、精製スキームを開発するために有用である、特異的な被分析物を優先的に保持する吸着体を同定する能力を示す。

A. 種々の吸着体および同じ溶離物（水）を使用する、早生児尿中の被分析物の分離

早生児尿（ $2\mu\text{l}$ ）を、以下の異なる吸着体でコートされた、炭素処理された PEEKポリマー基質の種々のスポットに添加する：

- (1) C<sub>8</sub>疎水性 (Octyl Sepharose, Sigmaから入手可能)、
- (2) フェニル疎水性 (Phenyl Sepharose, Sigmaから入手可能)、
- (3) アニオン交換 (Q Sepharose, Sigmaから入手可能)、
- (4) カチオン交換 (S Sepharose, Sigmaから入手可能)
- (5) 固定化金属 (IDA-Cu, Chelating Sepharose, Pharmaciaから入手可能)、および
- (6) 固定化金属（トリス（カルボキシメチル）エチレンジアミン-Cu Sepharose）。

室温での15分間の加湿チャンバーにおけるインキュベーションの後、吸着体の各スポットを、選択性閾値調節物として水で洗浄する。各洗浄は、吸着体のスポットに、3回、 $1\mu\text{l}$ の洗浄溶液をピペットで出し入れする工程を包含する。このプロセスを、洗浄溶液の新鮮なアリコートを用いて反復する。シナピン酸の $0.3\mu\text{l}$ のアリコート（ $5\text{mg/ml}$  50%アセトニトリル；0.5% TFA）を添加し、そして風乾させる。アレイを、窒素レーザー（355nm）および150cmフライトチューブを使用する、Hewlett Packard (Model 2030) からのレーザー脱着／イオン化飛行時間型質量分析器で分析する。データを、HP MALDI TOFソフトウェアによって分析し、そしてデータオーバーレイ表示について、GRAMS/32cにエクスポートする。

図8Aおよび8Bは、クロマトグラフィーシリーズの種々の吸着体に対する早生児尿タンパク質認識プロファイルの、低いまたは高い分子量での混成マスペクトルを示す。種々の吸着体（それぞれ異なる結合特性を有する）に対する単一

の選択性閾値調節物（すなわち、水）の使用は、異なる吸着体におけるような複合タンパク質混合物の異なる成分の保持を、示差的に増強または減少する。

B. 基質に間接的に結合される疎水性フェニル吸着体、および3つの異なる溶離物を使用する、早生児尿中の被分析物の分離

早生児尿（2  $\mu$ l）を、フェニル疎水性吸着体（Phenyl Sepharose, Sigmaから入手可能）でコートされた、炭素処理されたPEEKポリマー基質の種々のスポットに添加する。室温で、15分間の、加湿チャンパーにおけるインキュベーション後、吸着体の各スポットを、以下の溶離物（選択性閾値調節物）の1つで洗浄する：

- (1) 水、
- (2) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、0.15M NaCl、pH7.0中の2M尿素、および
- (3) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、0.15M NaCl、pH7.0中の0.1% Tween20。

各洗浄は、吸着体のスポットに、3回、1  $\mu$ lの洗浄溶液をピペットで出し入れする工程を包含する。このプロセスを、洗浄溶液の新鮮なアリコートを用いて反復する。その後、吸着体のスポットを、1  $\mu$ lの水で2回洗浄する。シナピン酸溶液の0.3  $\mu$ lのアリコート（5 mg/ml 50%アセトニトリル：0.5%TFA）を添加し、そして風乾させる。アレイを、窒素レーザー（355nm）および150cmフライトチューブを使用する、Hewlett Packard (Model 2030) からのレーザー脱着/イオン化飛行時間型質量分析器で分析する。データを、HP MALDI TOFソフトウェアによって分析し、そしてデータオーバーレイ表示について、GRAMS/32Cにエクスポートする。

図9は、クロマトグラフィーシリーズの疎水性フェニル吸着体に対する早生児尿タンパク質認識プロファイルの混成マススペクトルを示す。単一の吸着体に対する、異なる溶出特性を有する種々の溶離物の適用は、複合タンパク質混合物の異なる成分の保持を、示差的に増強または減少する。成分の1つ（によって記

される）は、PBS中の0.1% Tween20が、溶離物として使用される場合、疎水性フェニル吸着剤に選択的に保持される。

V. 2つの異なる細胞生物からの培養培地中のタンパク質の同定

この実施例は、細胞中で示差的に発現されるタンパク質の、吸着体アレイ：クロマトグラフィーシリーズでの同定を説明する。

2つの異なる乳ガン細胞株を、一定組成の培養培地において、同じ期間、培養する。濾過ユニットでの濃縮後、各培養培地の1  $\mu$  lのアリコートを、基質としての、酸化ケイ素でコートされたステンレススチールに対してコートされる固定化金属（トリス（カルボキシメチル）エチレンジアミン-Cu）吸着体の吸着体アレイ（CiphaGen Biosystems, Inc, Palo Alto, CA）の種々のスポットに添加する。室温で、15分間の、加湿チャンバーにおけるインキュベーションの後、吸着体のスポットを、以下の溶離物（選択性閾値調節物）のいずれか1つで洗浄する：

- (1) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、0.5M NaCl、pH7.0、
- (2) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、0.5M NaCl、pH7.0中の20mMイミダゾール、
- (3) 0.1M酢酸ナトリウム緩衝液、0.5M NaCl、pH4.5、
- (4) 20mMリン酸ナトリウム緩衝液、0.15M NaCl、pH7.0中の0.1% Tween20、
- (5) 10mMリン酸ナトリウム緩衝液、0.5M NaCl、pH7.0中の3M尿素、または
- (6) 1% TFA。

各洗浄は、吸着体のスポットに、3回、1  $\mu$  lの洗浄溶液をピペットで出し入れする工程を包含する。このプロセスを、洗浄溶液の新鮮なアリコートをを用いて反復する。その後、吸着体のスポットを、1  $\mu$  lの水で2回洗浄する。シナビン酸の0.3  $\mu$  lのアリコート（5 mg/ml 50%アセトニトリル：0.5%トリフルオロ酢酸）を添加し、そして風乾させる。アレイを、窒素レーザー（355nm）および60cmフライトチューブを使用する、レーザー脱着/イオン化飛行時間型質量分析器で分析する。データを、コンピューターによって分析し、そしてデータオーバーレイ表示について、GRAMS/32c (Galactic Industries Corporation) にエクスポートする。

図10Aは、固定化金属（Cu）のクロマトグラフィーシリーズ吸着体アレイに対

する細胞株1の細胞分泌タンパク質認識プロファイルの混成マスペクトルを示す。単一の吸着体に対する、異なる選択性閾値の種々の溶離物の適用は、細胞培養培地のような複合タンパク質混合物の異なる成分の保持を、示差的に増強また

は減少する。

図10Bは、固定化金属 (Cu) のクロマトグラフィーシリーズ吸着体アレイに対する両方の細胞株の細胞分泌タンパク質認識プロファイルの混成マスペクトルを示す。同じ溶離物、10mMリン酸ナトリウム緩衝液、0.5M NaCl、pH7.0中の0.1% Tween20+ 3M尿素を使用して、未保持の物質を洗浄して取り除く。7532Daを示すピークは、細胞株2において発現されない細胞株1の分泌タンパク質において、主要な保持されたピークである。

図10Cは、固定化金属 (Ni) のクロマトグラフィーシリーズ吸着体アレイに対する細胞株1の細胞分泌タンパク質認識プロファイルの混成マスペクトルを示す。同じ溶離物、10mMリン酸ナトリウム緩衝液、0.5M NaCl、pH7.0中の0.1% Tween20+ 3M尿素を使用するが、異なる表面相互作用ポテンシャルの吸着体 (すなわち、固定化Ni金属対固定化Cu金属) を用いて、7532Daピークは、全ての細胞株1の分泌タンパク質の間で唯一保持されるタンパク質である。挿入図は、拡張された尺度における、同じマスペクトルを示す。3766Daでのより小さなピークは、同じタンパク質の二重に荷電された種である。

図10Dは、インサイチュトリプトファン消化の前 (下方のプロファイル) および後 (最上部のプロファイル) の、固定化金属 (Ni) のクロマトグラフィーシリーズ吸着体アレイに対する細胞株1の細胞分泌タンパク質認識プロファイルの混成マスペクトルを示す。純粋なタンパク質について作製されたペプチドマップは、そのタンパク質のフィンガープリントであり、そして同定のために使用され得る。

#### VI. 2Dゲル電気泳動と被保持物クロマトグラフィーとの比較

被保持物クロマトグラフィーの1つの利点は、多様な次元において被分析物を迅速に分離する能力であり、多様な物理化学特性についての高い情報量を得ることである。対照的に、2Dゲル電気泳動は、2次元のみにおける分離を提供する。

図11は、クロマトグラフィーシリーズのフェニル疎水性吸着体に対する早生児尿タンパク質認識プロファイルを示す。種々の溶離物および吸着体の適用は、多次元の情報を与える。異なる選択条件の使用は、複合タンパク質混合物 (例えば

、早生児尿)の種々の成分の保持を、示差的に増強または減少し、被分析物の詳細な分離を生じる。

対照的に、図12は、pIおよび分子量に従う、早生児尿中のタンパク質の2次元分別を示す。被保持物クロマトグラフィーにおいて吸着体として使用される6次元に比較して、ゲルは、2次元についてのみの情報を提供する。スポットはまた、質量分析法によって分離されず、そして非常に高いおよび非常に低い分子量での分離は制限される。

## VII. 試料からの被分析物の連続的な抽出

被分析物は、試料を選択条件に連続的に曝露し、次いで未保持の試料を回収することによって、試料から連続的に抽出され得る。

Hemophilus ノックアウト変異体溶解物を、10%グリセロール 50mM EDTA中に調製した。遠心分離後、上清を、25mM HEPES、pH7.4中の0.01% Triton X100に、1:3に希釈した。希釈した試料の2  $\mu$  lのアリコートを、吸着体アレイのアニオン性部位のスポットに添加した。室温での30分間のインキュベーション後、アニオン性部位における残余の試料を、吸着体アレイの正常相部位のスポットに移した。アニオン性部位のスポットを、2  $\mu$  lの0.01%Triton X100 25mM HEPESで、2回、洗浄した。各洗浄は、10回、スポットに洗浄溶液をピペットで出し入れすることによって達成した。洗浄液を、正常相スポットに最初に添加した試料と合わせた。

室温で30分間のインキュベーション後、正常相部位における残余の試料を、吸着体アレイNi(II)部位のスポットに移した。正常相部位のスポットを、2  $\mu$  lのリン酸緩衝化生理食塩水で、2回、洗浄した。各洗浄を、10回、スポットに洗浄溶液をピペットで出し入れすることによって達成した。洗浄液を、Ni(II)スポットに最初に添加した試料と合わせた。

試料を、Ni(II)スポット上でほとんど乾燥するまで濃縮したのち、未結合の被分析物を、2  $\mu$  lの、リン酸緩衝化生理食塩水中の100mMイミダゾールで、2回

洗浄することによって回収した。各洗浄を、10回、スポットに洗浄溶液をピペッ

トで出し入れすることによって達成した。洗浄液を、吸着体アレイ脂肪族疎水性部位のスポットに移した。

試料を、疎水性部位においてほとんど乾燥するまで濃縮させ、未結合の被分析物を、 $2\mu\text{l}$ の、0.1%トリフルオロ酢酸中の5%アセトニトリルで、2回、洗浄することによって除去した。各洗浄を、10回、スポットに洗浄溶液をピペットで出し入れすることによって達成した。

アニオン性、正常相、Ni(II)、および疎水性部位の各スポットを、 $2\mu\text{l}$ の水で洗浄して、残余の緩衝液を除去した。50%アセトニトリル0.5%トリフルオロ酢酸中のシナビン酸溶液の $0.3\mu\text{l}$ のアリコート、を、各スポットに添加した。各部位に保持された被分析物を、レーザー脱着/イオン化飛行時間型質量分析器で分析した。

図19A~19Dは、吸着体アレイにおけるHemophilus溶解物の保持マップを示す。質量範囲3000~25000Daにおける複数のピークを、吸着体において観察した。各吸着体が、試料中のそれぞれの被分析物について、異なる保持を示すことに注意のこと。

#### VIII. 被分析物の漸進的分離

被分析物を分離する選択条件に対する特徴に、新規な結合特性または溶出特性を付加することによって、被分析物の改善された分離を提供する選択条件を開発し得る。この例において、試料を、Cu(II)吸着体に結合し、そして1つの第1の溶離剤および2つの第2の溶離物に曝露した。第2の溶離物は、別の溶出条件の付加によって、第1の溶離物とは異なる。各付加された条件は、被分析物の分離を改善した。

10%グリセロール中に調製された、Hemophilus野生型定常状態の溶解物を、20mMリン酸ナトリウム、0.5M塩化ナトリウム、pH7.0中に1:1希釈した。遠心分離後、上清の $150\mu\text{l}$ のアリコートを、バイオプロセッサにおいて、吸着体アレイCu(II)部位の各スポットとともに、インキュベートした。30分間低温で混合した後、試料を取り出した。各スポットを、異なる溶解物で洗浄した。最初のスポット



トを、 $150\mu\text{l}$ の $20\text{mM}$ リン酸ナトリウム、 $0.5\text{M}$ 塩化ナトリウム、 $\text{pH}7.0$ で洗浄した。第2のスポットを、 $20\text{mM}$ リン酸ナトリウム、 $0.15\text{M}$   $\text{NaCl}$ 、 $\text{pH}7.0$ に加えた $150\mu\text{l}$ の $0.05\%$  Triton X100の $150\mu\text{l}$ で洗浄した。第3のスポットを、 $20\text{mM}$ リン酸ナトリウム、 $0.15\text{M}$   $\text{NaCl}$ 、 $\text{pH}7.0$ に加えた $150\mu\text{l}$ の $100\text{mM}$ イミダゾールで洗浄した。各洗浄を、混合しながら、5分間、スポットとともに洗浄溶液をインキュベートすることによって達成した。洗浄を、2回、反復した。各スポットを水で洗浄して、界面活性剤および緩衝液を除去した。

吸着体アレイを、バイオプロセッサから除去した。 $50\%$ アセトニトリル $0.5\%$ トリフルオロ酢酸中のシナピン酸溶液の $0.3\mu\text{l}$ のアリコート各スポットに添加した。各スポットに保持された被分析物を、レーザー脱着/イオン化飛行時間型質量分析器で分析した。

図20A~20Cは、上記の3つの溶出条件下での洗浄後の、吸着体アレイCu(II)部位におけるHemophilus溶解物の保持マップを示す。質量範囲 $2000\sim 18000\text{Da}$ における複数のピークが観察された。「 $\cdot$ 」で記されるタンパク質は、図20Aの保持マップにおけるごく少数の成分である。選択条件が、界面活性剤であるTriton X100の同じ緩衝液への添加によって改変された場合(図20B)、同じタンパク質「 $\cdot$ 」は、他の被分析物よりも良好に保持され、そして良好に分離された。選択条件が、アフィニティー排除物質であるイミダゾールの同じ緩衝液への添加によって改変された場合(図20C)、タンパク質「 $\cdot$ 」は、被保持物マップにおいて他の被分析物から高度に分離された。

被分析物についての改善された分離を伴う選択条件の前進的な同定のこのストラテジーは、全Hemophilus溶解物からこのタンパク質を調製的に精製するための方法を開発するために採用され得る。

IX. 被分析物の示差的な発現：マーカータンパク質の発見。

#### A. ヒト血清

正常なヒト血清または疾患のヒト血清の $0.5\mu\text{l}$ のアリコートを、等容量の $20\text{mM}$ リン酸緩衝液、 $0.5\text{M}$   $\text{NaCl}$ 、 $\text{pH}7.0$ で希釈した。それぞれ、吸着体アレイCu(II)部位における異なるスポットに適用した。 $4^\circ\text{C}$ で1時間のインキュベーション後、

各スポットを $2\mu\text{L}$ の $20\text{mM}$ リン酸ナトリウム、 $0.5\text{M}$   $\text{NaCl}$ 、 $\text{pH}7.0$ で、2回洗浄した。各洗浄は、10回、スポットに洗浄溶液をピペットで出し入れすることによって達成した。各スポットを最終的に $2\mu\text{L}$ の水で洗浄して、残余の緩衝液を除去した。50%アセトニトリル0.5%トリフルオロ酢酸中のシナピン酸溶液の $0.3\mu\text{L}$ のアリコートを、各スポットに添加した。各スポットに保持された被分析物を、レーザー脱着/イオン化飛行時間型質量分析器で分析した。

図21Dにおいて、「f」で記されるタンパク質は、正常な血清におけるよりも疾患の血清において有意に多い量で存在する。結果は、臨床的診断に使用され得る疾患マーカーの発見のための方法を説明する。

#### B. マウス尿

正常なマウス尿、疾患のマウス尿、または薬物処置したマウス尿の $1\mu\text{L}$ のアリコートを、吸着体アレイCu(II)部位の異なるスポットに適用した。室温で10分間のインキュベーション後、各スポットを、 $20\text{mM}$ リン酸ナトリウム、 $0.15\text{M}$   $\text{NaCl}$ 、 $\text{pH}7.0$ 中の $2\mu\text{L}$ の $100\text{mM}$ イミダゾールで、2回洗浄した。各洗浄は、10回、スポットに洗浄溶液をピペットで出し入れすることによって達成した。各スポットを最終的に $2\mu\text{L}$ の水で洗浄して、残余の緩衝液を除去した。50%アセトニトリル0.5%トリフルオロ酢酸中のシナピン酸溶液の $0.3\mu\text{L}$ のアリコートを、各スポットに添加した。各スポットに保持された被分析物を、レーザー脱着/イオン化飛行時間型質量分析器で分析した。

正常マウス尿（コントロール）、疾患のマウス尿、および薬物処置したマウス尿の被保持物マップを、図1に示す。1つの被分析物は、疾患のマウス尿において非常に高い量で存在することが見出され（真ん中のパネル）、同じ被分析物は、正常なマウス尿においては見出されず（上部のパネル）、そして非常に減少された量で、薬物処置したマウス尿において見出された（下部のパネル）。この被分析物は、潜在的な疾患マーカーとして使用され得る。定量的な診断アッセイの実行可能性を説明するために、保持されたマーカータンパク質のピーク下の面積を算定し、そして表において示す。明らかな定量的差異が、疾患マウス尿と薬物処理されたマウス尿との間に観察される。実験の変動性について補正するために、

内部標準被分析物を使用した。各尿試料についての正規化された疾患マーカーのピーク面積（すなわち、内部標準のピーク面積で割ったマーカーのピーク面積）を、下部のパネルに示す。薬物処置後に、疾患尿マーカーの少なくとも10倍の減少が存在する。

### C. ヒト尿

正常なヒトおよびガン患者からの尿を、リン酸緩衝化生理食塩水中の0.01% Triton X100中に1:2に希釈した。正常なヒト尿または疾患のヒト尿の1.5  $\mu$ lのアリコートと、0.5  $\mu$ lのイソプロパノール/アセトニトリル（1:2）0.1%トリフルオロ酢酸で予め湿潤した吸着体アレイ脂肪族疎水性部位の異なるスポットに適用した。4℃で30分間のインキュベーション後、各スポットを、2  $\mu$ lの、10 mM Tris HCl、0.05M NaCl、pH7.5中の50%エチレングリコールで、2回洗浄した。各洗浄は、10回、スポットに洗浄溶液をピペットで出し入れすることによって達成した。各スポットを最終的に2  $\mu$ lの水で洗浄して、残余のエチレングリコールおよび緩衝液を除去した。50%アセトニトリル0.5%トリフルオロ酢酸中のシナピン酸溶液の0.3  $\mu$ lのアリコートを、各スポットに添加した。各スポットに保持された被分析物を、レーザー脱着/イオン化飛行時間型質量分析器で分析した。

4人のガン患者および正常なヒトの尿の被保持物マップを、図23Aに示す。複数のタンパク質ピークが、Tris/NaCl緩衝液中の50%エチレングリコールでの洗浄後に、吸着体アレイ疎水性部位において保持された。可能な疾患マーカーを同定するために、個々の患者の尿と正常な尿との間の差異マップをプロットした。ベースラインを超える差異プロットにおける各棒は、患者の尿により高い量で存在する被分析物を示す。（図23B～23D。）患者の差異マップのパターンにおける変化は、集団における個々の変動を反映する。しかし、約5000Da（\*で記す）の1つの被分析物、および約75000Da（\*で示す）の被分析物の塊は、全ての患者においてより高い量で一貫して存在することが見出され、それゆえ、これらは、潜在的な疾患マーカーとして同定され得る。

### X. ファージ提示ライブラリーからのファージの捕獲

タンパク質チップの表面に吸着されるウイルスは、脱着分光測定法によって検出され得る。吸着体として使用される、ウイルスコートタンパク質に対する抗体は、ウイルスを捕獲し得る。吸着体として使用される標的タンパク質は、標的に対して1本鎖抗体を示すファージを捕獲し得る。

#### A. 吸着体基質によるファージ提示抗体の検出感受性

増殖培地中のM13ファージ ( $10^{12}$  粒子/ml) を、25mM HEPES、pH7.4中の0.01% Triton X100に連続希釈した。それぞれの希釈したファージ懸濁液の0.25  $\mu$ l のアリコートを、吸着体アレイ脂肪族疎水性部位のスポットに添加した。50%アセトニトリル、0.5%トリフルオロ酢酸中のCHCAの0.3  $\mu$ l のアリコートを添加した。試料を、レーザー脱着/イオン化飛行時間型質量分析器によって分析した。

M13ファージ遺伝子VIIIタンパク質を、アレイにおいて高い感度で検出した。図24A~24E。検出可能なシグナル (シグナル/ノイズ > 2) が、ファージ懸濁液を、10,000,000倍に希釈した場合に、得られた。

#### B. 吸着体アレイによるM13ファージの同定

ウサギ抗M13抗体 (Stratagene) を、Protein A Hyper D (BioSeptra) 上に固定化し、そしてリン酸緩衝化生理食塩水、pH7で、広範囲に洗浄した。増殖培地中のM13ファージ ( $10^{12}$  粒子/ml) の1~10  $\mu$ l 懸濁液のアリコートを、4℃にて一晩、固定化された抗M13抗体の1  $\mu$ l のアリコートとともにインキュベートした。リン酸緩衝化生理食塩水、pH7中の0.05% Tween20で洗浄し、次いで水で洗浄して界面活性剤および緩衝液を除去した後、捕獲されたファージのアリコートを、シナピン酸の存在下、レーザー脱着/イオン化飛行時間型質量分析器で分析した。

抗M13抗体コントロールは、抗体シグナル (一重 (singly) および二重 (doubly) に荷電された) のみを示す。図25A。M13ファージが、抗体によって捕獲される場合、ファージからの最も容易に同定され得るタンパク質ピークは、遺伝子VIIIタンパク質、および1本鎖抗体との遺伝子IIIタンパク質の融合物である。図25B。M13ファージ遺伝子VIIIタンパク質は、この方法によって非常に高い効率で検出されるので、この方法は、ファージ捕獲の感度の高いモニターとして使

用され得る。

C. 1 本鎖抗体を示すM13ファージの特異的な捕獲

HIV-1 Tatタンパク質 (McKesson BioScrvices) を、予め活性化した基質に結合させた。エタノールアミンでのブロッキング後、アレイを、リン酸緩衝化生理食塩水、pH7中の0.005% Tween20、次いでリン酸緩衝化生理食塩水、pH7中の0.1% BSAで洗浄した。Tatタンパク質に対して1本鎖抗体を示すM13ファージの連続希釈を、4℃で一晩、Tatタンパク質吸着体アレイとともにインキュベートした。Tatタンパク質に対して1本鎖抗体を示さないM13ファージの連続希釈のネガティブコントロールもまた、同じ方法で、Tatタンパク質吸着体アレイとともにインキュベートした。アレイを、リン酸緩衝化生理食塩水中の0.05% Tween20で洗浄し、次いで、リン酸緩衝化生理食塩水、pH7.0中の1M尿素で洗浄し、そして最後に水で洗浄して緩衝液および尿素を除去した。50%アセトニトリル0.5%トリフルオロ酢酸中のCHCAの0.3 $\mu$ lのアリコートを追加した。保持されたファージを、レーザー脱着/イオン化飛行時間型質量分析器で分析する。

Tatタンパク質に対して1本鎖抗体を示すM13ファージの特異的な結合を、濃度依存性の様式において観察した(実線)。図26A~26D。非特異的なM13ファージによる非特異的な結合は、吸着体アレイにおいて最小であった(破線)。これらの結果は、標的被分析物を特異的に認識する1本鎖抗体をコードする遺伝子を含むファージを検出する、非常に感度が高い方法を説明する。

XI. 化合物がレセプターとリガンドとの間の結合を阻害するか否かを決定するためのスクリーニング

本発明の方法は、試験因子が、レセプターに対するリガンドの結合を調節するか否かを決定するために使用され得る。この例において、本発明者らは、被保持物クロマトグラフィーが、TGF- $\beta$ と、遊離TGF- $\beta$ レセプターによる吸着体として使用される結合したTGF- $\beta$ レセプターとの間の結合の阻害を検出し得ることを示す。

TGF- $\beta$ 組換えレセプター-Fcの融合タンパク質 (R&D、Minnesota) を、プロテ

インG吸着体アレイ上に特異的に結合した。TGF- $\beta$  (R&D、Minnesota) を、細胞

馴化培地 (2.5×濃縮化) に連続希釈し、そして4℃で一晩、レセプター-FcプロテインG吸着体アレイとともにインキュベートした。細胞馴化培地中の連続希釈したTGF- $\beta$ の別のセットを、調節化剤の存在下、レセプター-FcプロテインG吸着体アレイとともにインキュベートした。この説明において、調節化剤は、遊離のTGF- $\beta$ レセプターであった。同じ条件下でのインキュベーション後、チップを、PBS中の0.05% Triton X100、次いでPBS中の3M尿素で洗浄した。シナビン酸の0.3 $\mu$ lのアリコートを、各スポットに添加し、そしてレーザー脱着/イオン化飛行時間型質量分析法によって分析した。

図27Aは、レセプター-FcプロテインG吸着体アレイへの、1 $\mu$ g/ml TGF- $\beta$ の特異的な結合を示す(実線)。細胞馴化培地中のタンパク質は、結合されることが、ほとんどまたは全く見出されなかった。図27Bは、レセプター-FcプロテインG吸着体アレイへの、100ng/mlのTGF- $\beta$ の特異的な結合を示す(実線)。TGF- $\beta$ およびレセプター-FcプロテインG吸着体アレイのインキュベーションが、調節化剤(遊離のTGF- $\beta$ レセプター)の存在下で行われた場合、100ng/mlのTGF- $\beta$ が存在する場合、結合は完全に排除され(図27A、破線)、そして1 $\mu$ g/mlのTGF- $\beta$ が存在した場合、僅かな結合のみであった(図27B、破線)。この説明において、調節化剤(同じレセプター)は、リガンドに対して高い特異的な結合親和性を有し、従って標的被分析物結合事象の非常に効果的な拮抗を提供する。他の場合において、調節化剤の存在下および不在下で吸着体に結合される標的被分析物の比率は、調節化剤の抗力の指標を与える。

## XII. 被保持物クロマトグラフィーの分離力

この実施例は、被保持物クロマトグラフィーが、異なる選択条件下での試料のその平行な(Parallel)工程で、試料中のタンパク質を分離する能力を実証する。

Hemophilusインフルエンザ溶解物を、10%のグリセロール中に調製した。遠心分離後、上清を、25mM HEPES、pH7.4中の0.01%Triton X100中で、1:3に希釈した。希釈した試料の2 $\mu$ lのアリコートを、吸着体アレイのカチオン性部位のスポットに添加した。室温で30分間のインキュベーション後、スポットを25mM H

EPES、pH7.4で洗浄した。希釈物試料の $2\mu\text{l}$ の第2のアリコート、を、吸着体アレイ脂肪族疎水性部位のスポットに添加した。室温で30分間のインキュベーション後、スポットを水で洗浄した。希釈した試料の $2\mu\text{l}$ の第3のアリコートを、吸着体アレイCu(II)部位のスポットに添加した。室温で30分間のインキュベーション後、リン酸緩衝化生理食塩水、pH7.4中の0.05% Triton X100で、スポットを洗浄した。50%アセトニトリル0.5%トリフルオロ酢酸中のシナビン酸溶液の $0.3\mu\text{l}$ のアリコートを、各スポットに添加した。各部位に保持された被分析物を、レーザー脱着/イオン化飛行時間型質量分析器で分析した。

結果を、図28~31に示す。全ての保持された被分析物の計数は、約550であった。結果は、平行する複数の被分析物の分別および検出を包含する、組合せ的な分別についての方法を説明する。

### XIII. 多量体構造の連続的なアセンブリ

この実施例は、一次吸着体に対する二次吸着体を構築する方法を例示する。次いで、二次吸着体は、標的被分析物についての特異的な吸着体として作用する。

20mM Tris、10mM塩化ナトリウム、0.4% NP40、pH7.2中で希釈されたGST融合レセプターの $0.5\mu\text{l}$ のアリコートを、吸着体アレイの通常の部位のスポットに添加した。溶液を、ほとんど乾燥するまでスポット上で濃縮させた。スポットを、 $2\mu\text{l}$ の10mM Tris、50mM塩化ナトリウム、pH7.2で、3回、洗浄した。各洗浄は、吸着体のスポットに、洗浄溶液を5回、ピペットで出し入れすることによって達成された。このスポットを、最終的に $2\mu\text{l}$ の水で2回洗浄して、残余の緩衝液を除去した。50%アセトニトリル、0.5%トリフルオロ酢酸中のシナビン酸溶液の $0.3\mu\text{l}$ のアリコートをスポットに添加した。保持されたGST融合レセプターを、レーザー脱着/イオン化飛行時間型質量分析器で分析した。(図32。)

20mM Tris、100mM塩化ナトリウム、0.4% NP40、pH7.2中のGST融合レセプターの $0.5\mu\text{l}$ のアリコートを、吸着体アレイの通常の部位のスポットに添加した。GSTタンパク質のみを含有する試料(レセプターを含有しない)を、ネガティブコントロールとして、別のスポットに適用した。溶液を、ほとんど乾燥するまでスポット上で濃縮させた。 $10\text{mM}$  Tris、 $50\text{mM}$ 塩化ナトリウム、pH7.2の $0.5\mu\text{l}$ を、

各スポットに添加した。溶液を、室温にて10秒間の放置後、ピペットを使用して取り出した。

96個の他のリガンドのライブラリーにおける1つの特異的なリガンドを含有する溶液の $1\mu\text{l}$ のアリコートを、各スポットに即座に添加した。吸着体アレイを、室温で1時間、加湿チャンバーにおいてインキュベートした。各スポットを $2\mu\text{l}$ の、水中の30%イソプロパノール：アセトニトリル（1：2）で、2回洗浄した。各洗浄は、10回、スポットに洗浄溶液をピペットで出し入れすることによって達成した。50%アセトニトリル、0.5%トリフルオロ酢酸中の $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸溶液の $0.3\mu\text{l}$ のアリコートで、スポットに添加した。レセプター上に捕獲されたリガンドを、レーザー脱着／イオン化飛行時間型質量分析器で分析した。

図33Aは、このリガンドを吸着体アレイの通常部位に捕獲するGST融合レセプターへの、96個の他のリガンドのライブラリー以外の特異的なリガンドの結合を示す。図33Bは、実験のネガティブコントロールとして作用する同じアレイに捕獲されたGSTタンパク質単独（レセプターを含有しない）へのリガンドの結合は存在しないことを示す。

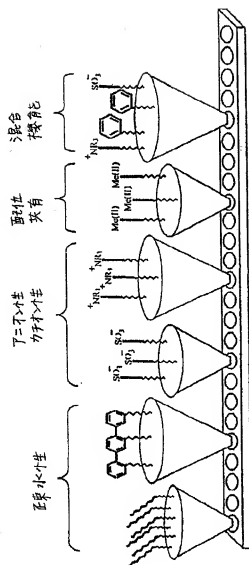
本発明は、被保持物クロマトグラフィーについての新規な物質および方法を提供する。特定の例が提供されたが、上述の記載は、例示的なものであって、限定的なものではない。本発明の多くの変形が、本明細書を検討する際に、当業者に明らかになる。それゆえ、本発明の範囲は、上述の記載を参照して決定されるべきでないが、その代わりに添付の請求の範囲に沿って、それらの十分な範囲の等価物とともに参照することによって決定されるべきである。

本出願において引用される全ての刊行物および特許書類は、各個々の刊行物または特許書類が、個々に記載されるのと同じ程度に、全ての目的のためにそれらの全体が参考として援用される。この書類における種々の参考文献のこれらの引用により、出願人らは、任意の特定の参考文献が出願人らの発明に対する「先行技術」であることを認めない。



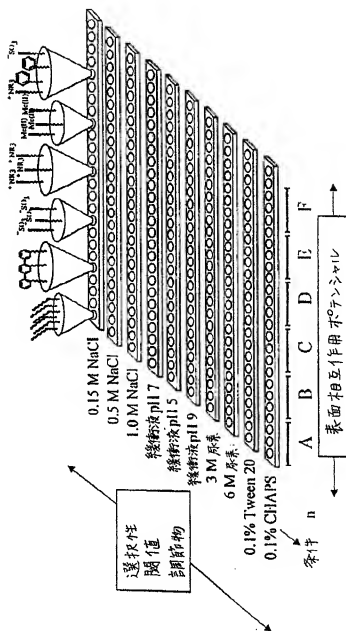
【図1】

Figure 1



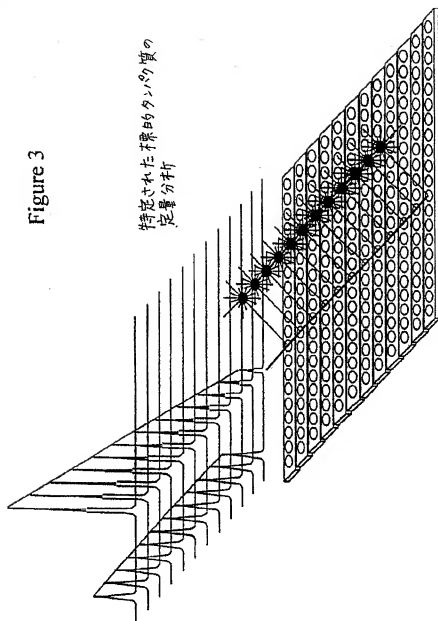
【図 2】

Figure 2



【図3】

Figure 3



【図4】

Figure 4A

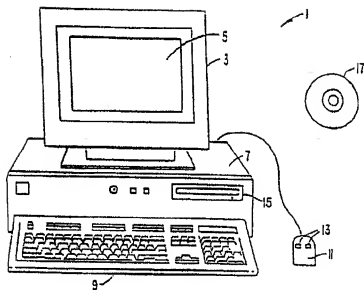
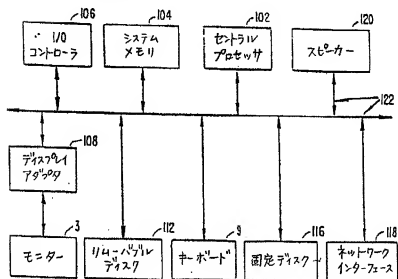
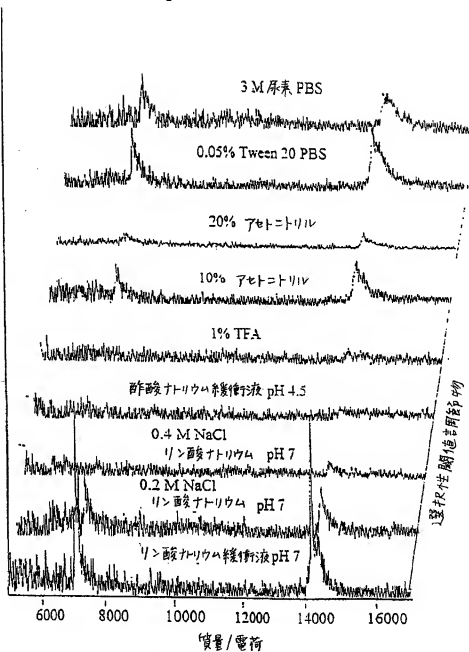


Figure 4B



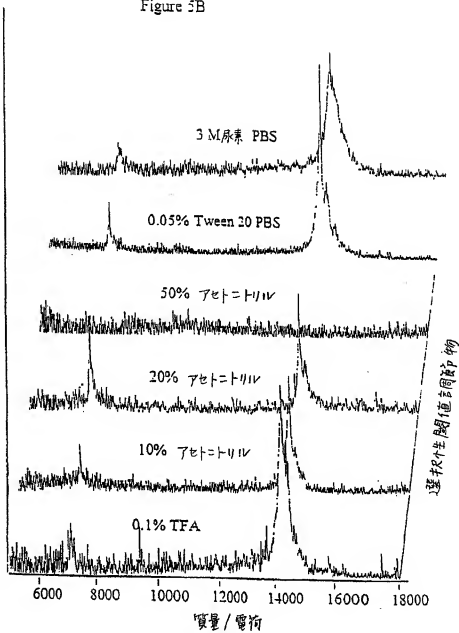
【図5】

Figure 5A



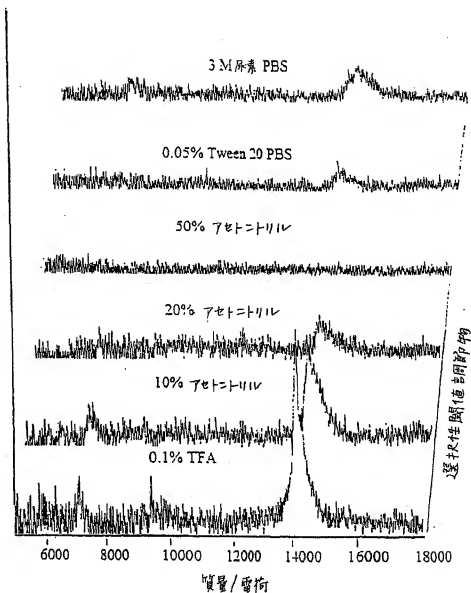
【図5】

Figure 5B



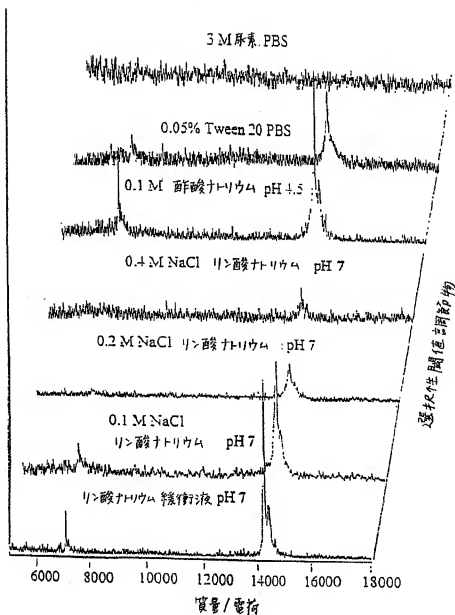
【図5】

Figure 5C



【図5】

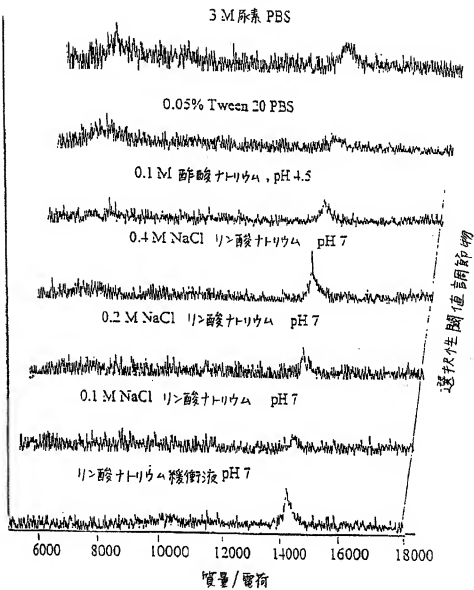
Figure 5D





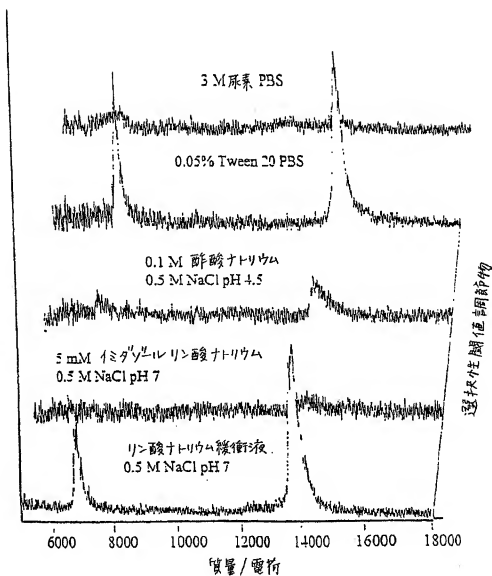
【図5】

Figure 5E



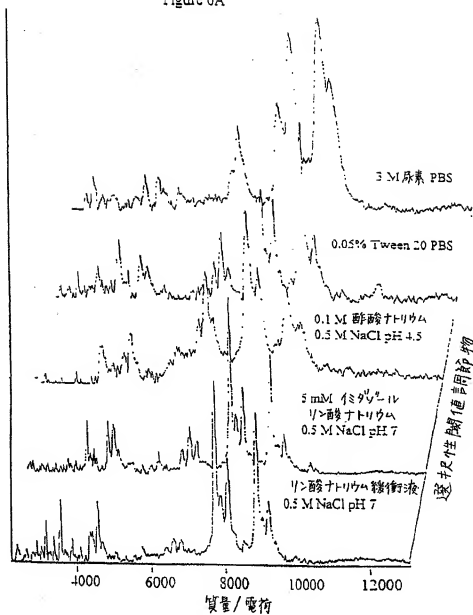
【図5】

Figure 5F



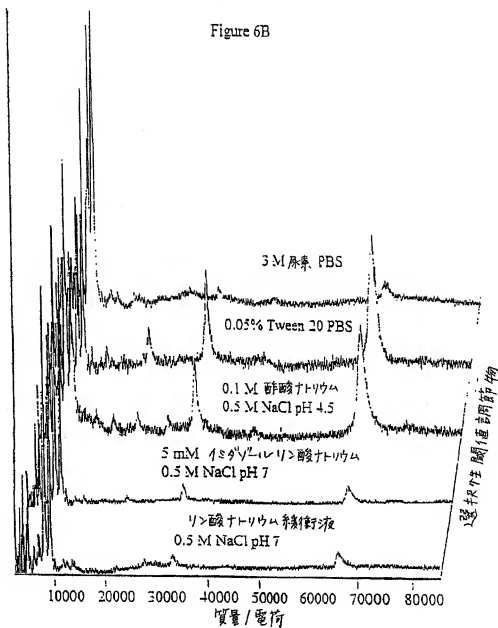
【図6】

Figure 6A



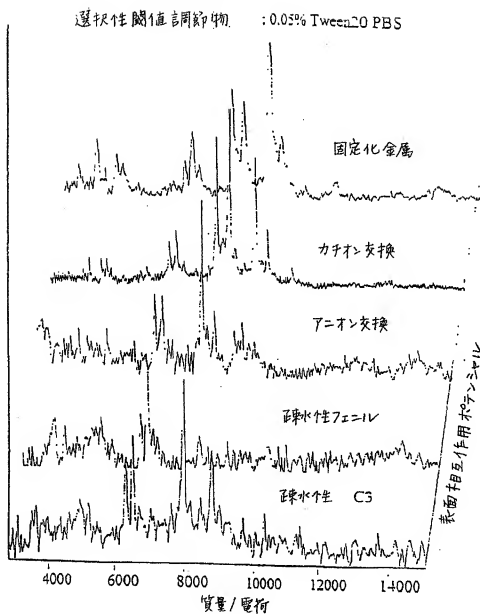
【図6】

Figure 6B



【図7】

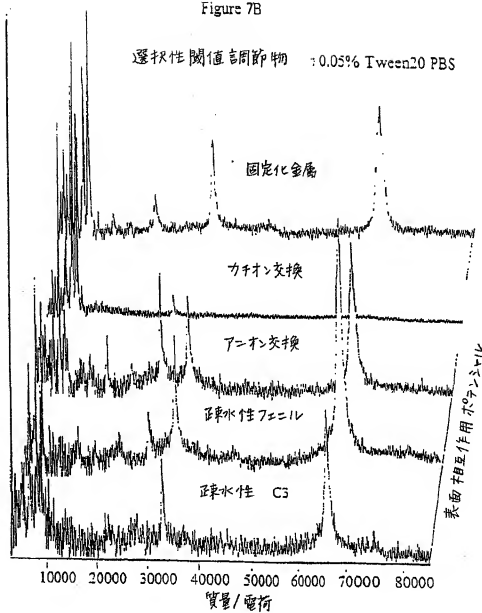
Figure 7A



【図7】

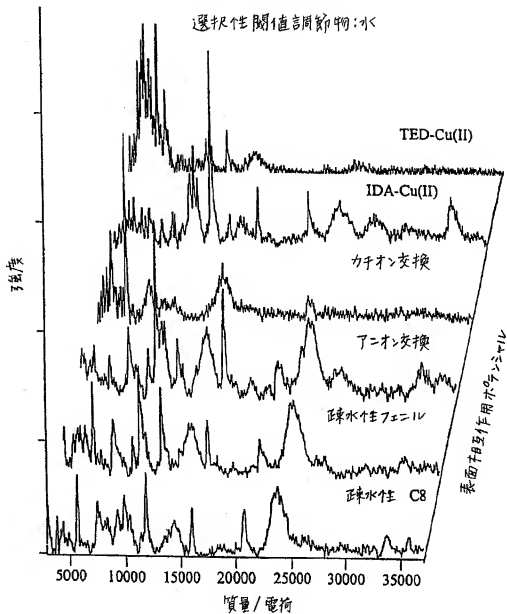
Figure 7B

選択性閾値調節物 0.05% Tween20 PBS



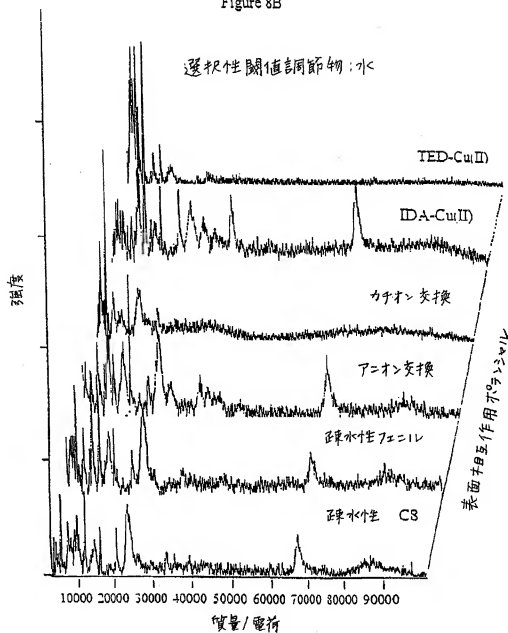
【図8】

Figure 8A



【図8】

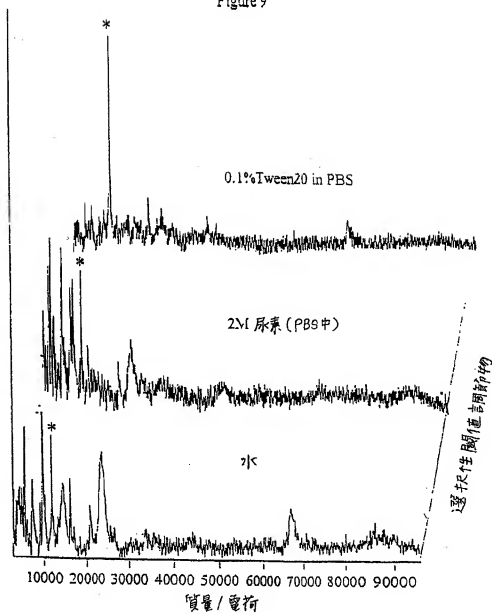
Figure 8B





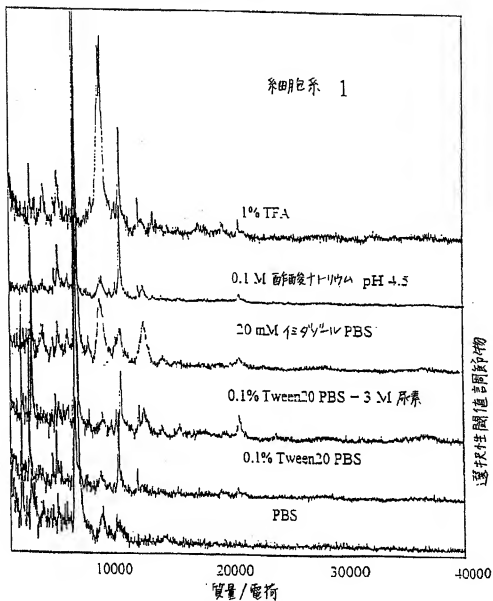
【图9】

Figure 9



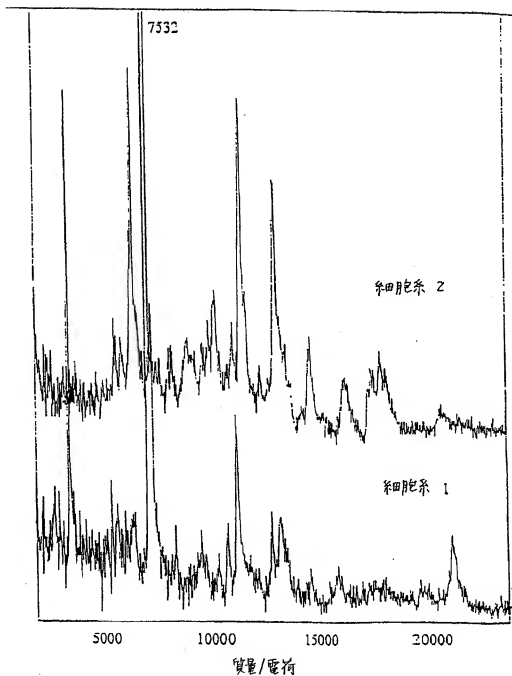
【図10】

Figure 10A



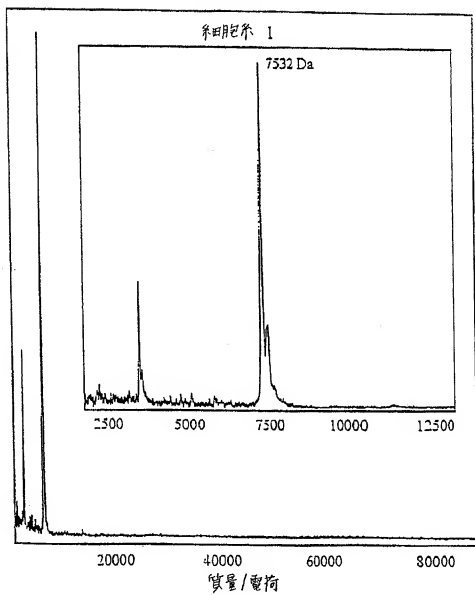
【図10】

Figure 10B



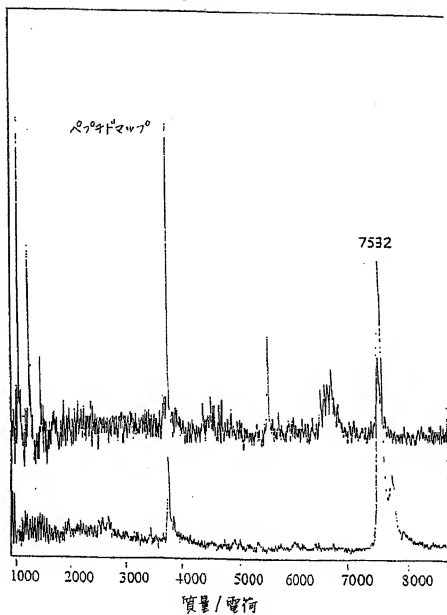
【图10】

Figure 10C



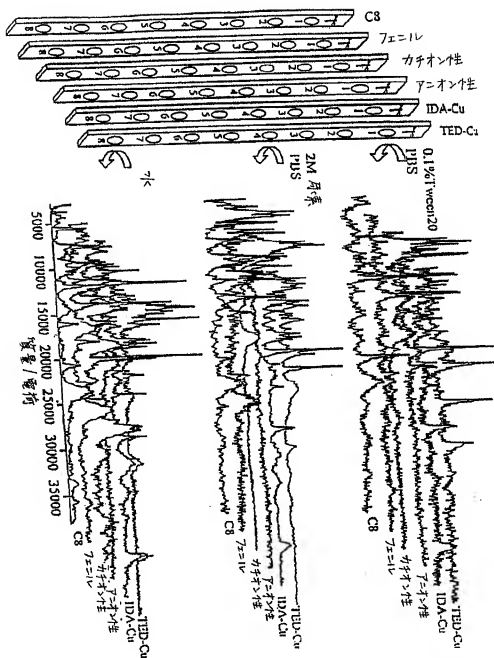
【図10】

Figure 10D



【図11】

Figure 11



【図12】

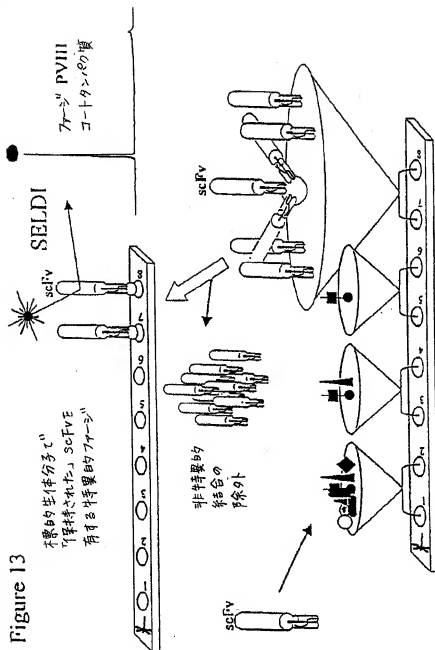
第一次元等電点電気泳動



第二次元 SDS PAGE

FIG. 12.

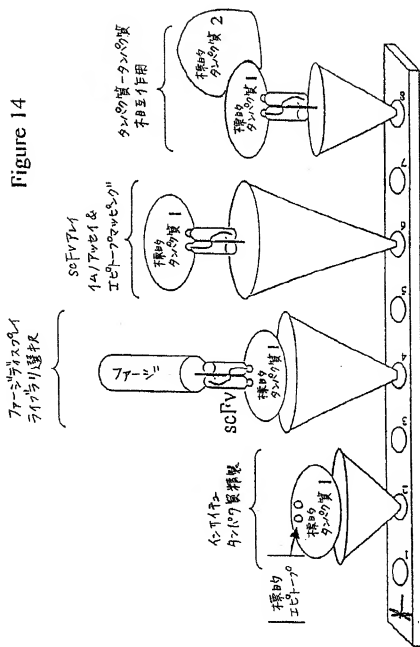
【図13】



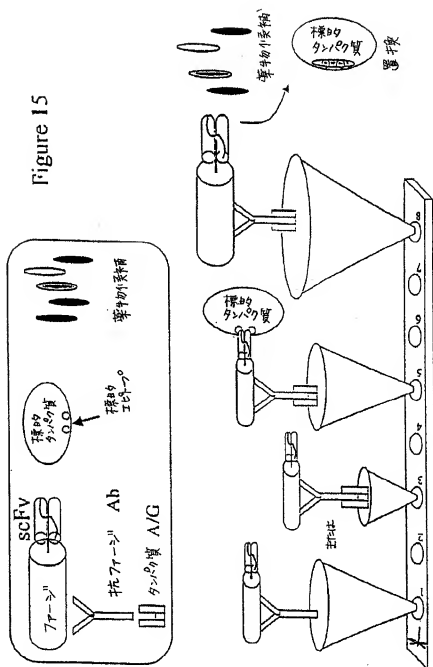


【図14】

Figure 14

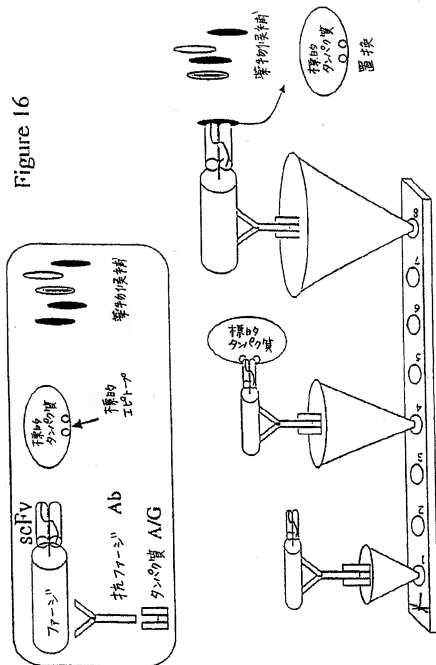


【図15】

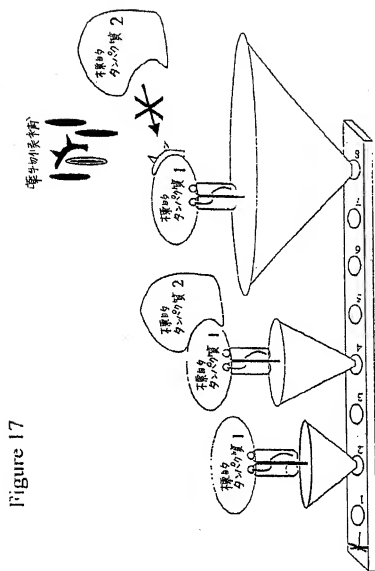


【図16】

Figure 16

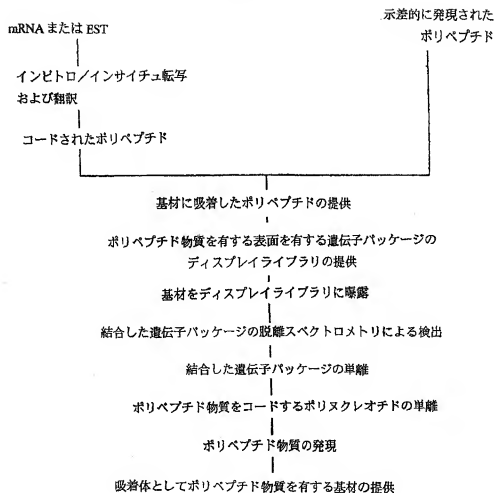


【図17】



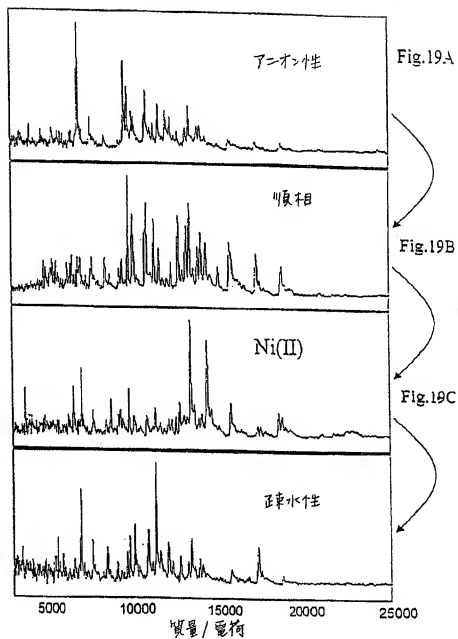
【図18】

Fig. 18



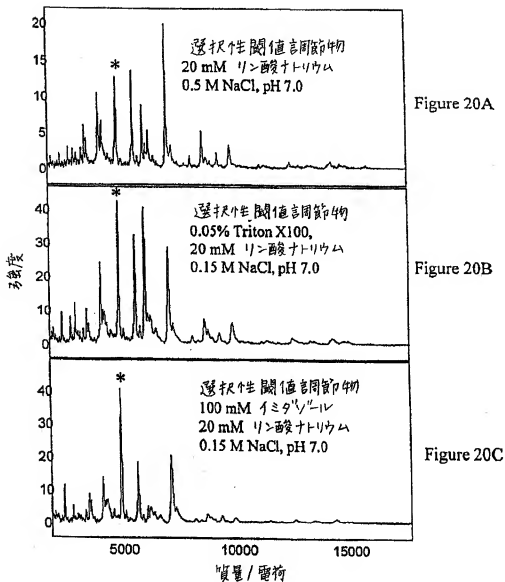
【図19】

Figure 19



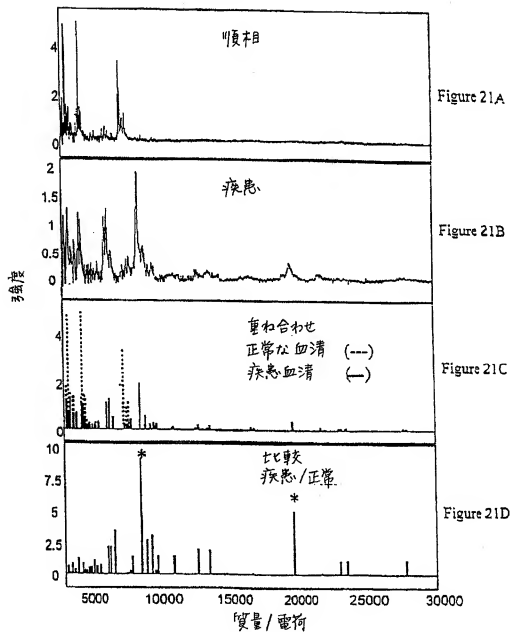
【図20】

Figure 20



【図21】

Figure 21





【図22】

Figure 22

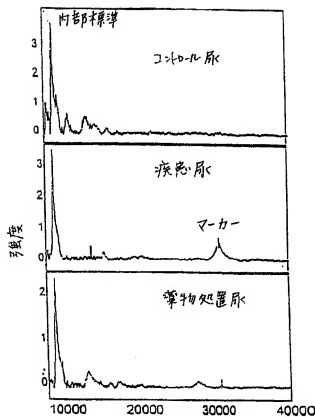


Figure 22A

Figure 22B

Figure 22C

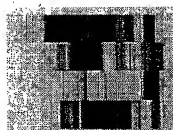
試料	タンパク質	面積
疾患	内部標準	1139
	マーカー	695
薬物処置	内部標準	1383
	マーカー	71

Figure 22D

正規化マーカーピーク面積 (マーカー / 内部標準)

コントロール	0.0
疾患	0.61
薬物処置	0.05

【図23】



カン患者 ①  
 カン患者 ②  
 カン患者 ③  
 正常取

FIG. 23A.



FIG. 23B.

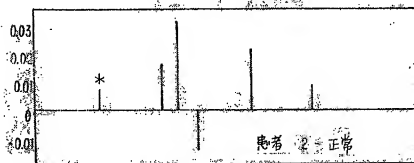


FIG. 23C.

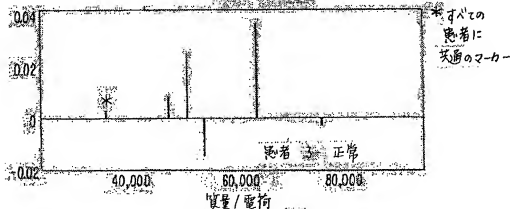
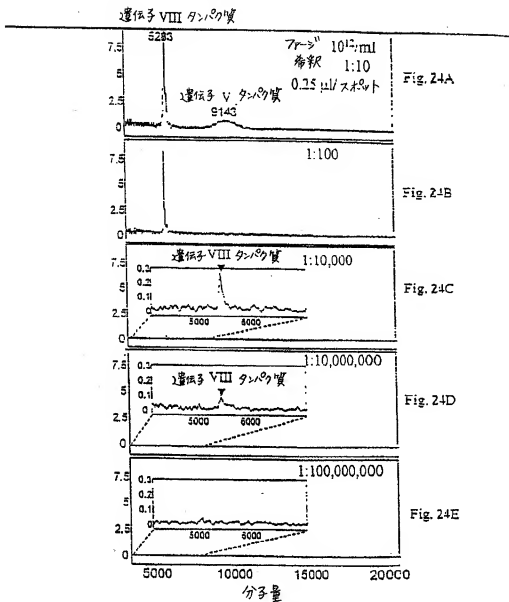


FIG. 23D.

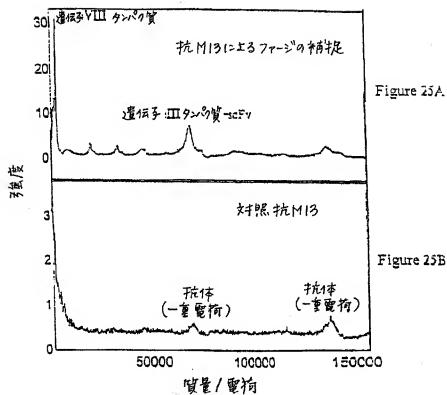
【図24】

Figure 24



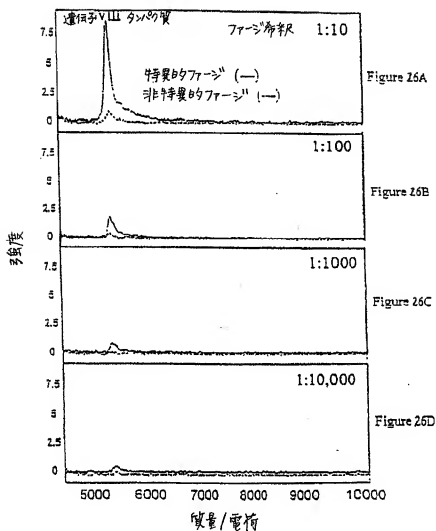
【図25】

Figure 25



【図26】

Figure 26



【図27】

Figure 27

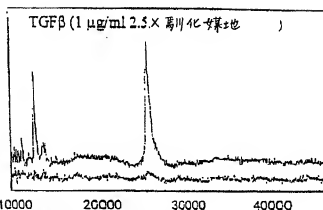


Figure 27A

遮断装置セクターなしでの測定 (一)  
 遮断装置セクターありでの測定 (一)

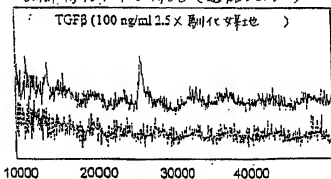
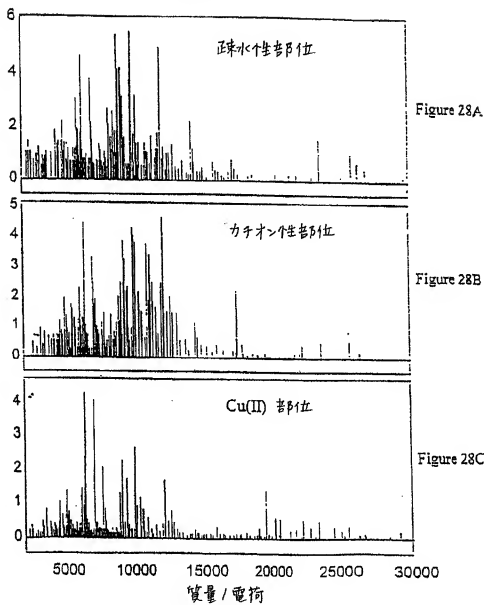


Figure 27B

質量/電荷

【図28】

Figure 28



【図29】

Figure 29

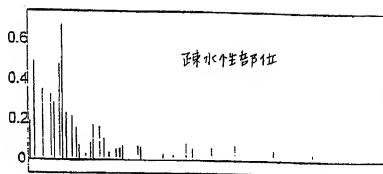


Figure 29A

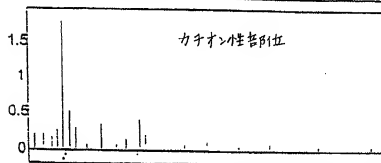


Figure 29B

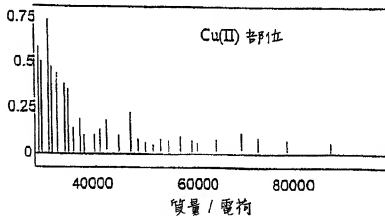
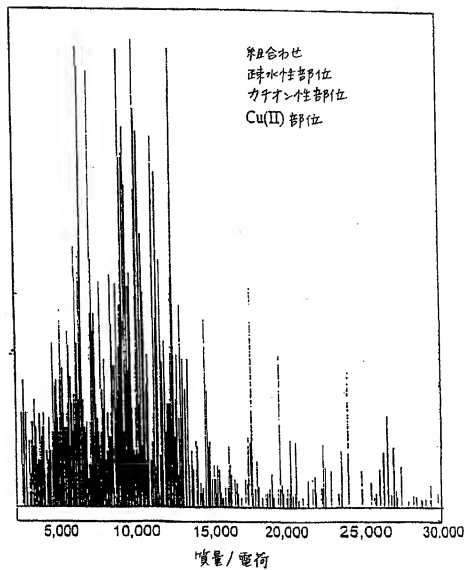


Figure 29C



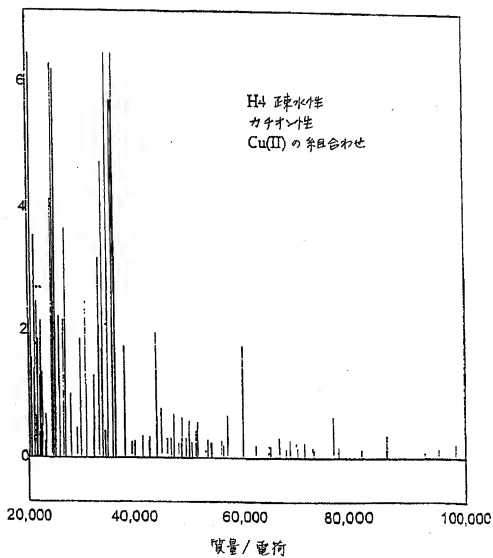
【図30】

Figure 30



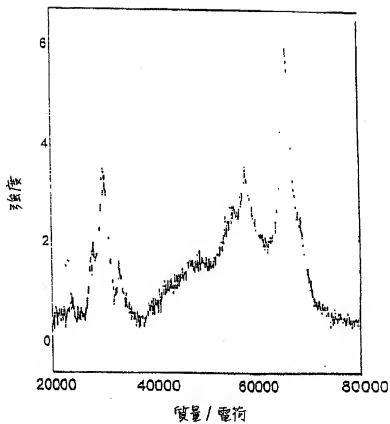
【図31】

Figure 31



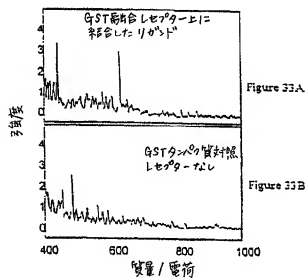
【図32】

Figure 32



【図33】

Figure 33



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 98/12908

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 H01J49/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 H01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 453 199 A (AFEYAN NOUBAR B ET AL) 26 September 1995 see column 1, line 7-13 see column 4, line 4-18 see column 5, line 17-55 see column 10, line 17-36 see column 11, line 22-60 see column 18, line 55-63	1,4,7
A	US 5 498 545 A (VESTAL MARVIN L) 12 March 1996 see abstract; figure 1	1,4
X	WO 89 03430 A (TERRAPIN DIAGNOSTICS LTD) 20 April 1989 see page 9, line 1-18 see page 18, line 27 - page 19, line 2 see page 39, line 31 - page 41, line 22 -/-	9,12,14



Further documents are listed in the continuation of box C



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the distinct invention cannot be considered novel or claimed the considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 November 1998

Date of mailing of the international search report

24/11/1998

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5816 Patentkanal 2  
NL - 5280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2240, Tx: 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Zinngrebe, U

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.  
PCT/US 98/12908

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 752 562 A (SHEJMAN MARK I ET AL) 21 June 1988 see column 1, line 14-21 see column 3, line 46 - column 4, line 32 -----	10,19, 21,28
A	GB 2 281 122 A (ZENECA LTD) 22 February 1995 see page 1, last paragraph - page 2, paragraph 2 see page 5, paragraph 2 -----	19,21,28

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.  
PCT/US 98/12908

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5453199 A	26-09-1995	US 5372719 A	13-12-1994
		US 5641539 A	24-06-1997
		AU 663184 B	28-09-1995
		AU 3928493 A	08-11-1993
		CA 2132987 A	14-10-1993
		EP 0633811 A	18-01-1995
		JP 7505335 T	15-06-1995
US 5498545 A	12-03-1996	WO 9319844 A	14-10-1993
		AU 2960895 A	22-02-1996
		EP 0771470 A	07-05-1997
WO 8903430 A	20-04-1989	WO 9603768 A	08-02-1996
		AT 152244 T	15-05-1997
		AU 635492 B	25-03-1993
		AU 2790989 A	02-05-1989
		DE 3855890 D	28-05-1997
		DE 3855890 T	12-02-1998
		EP 0387276 A	19-09-1990
		JP 2674048 B	12-11-1997
		JP 7072151 A	17-03-1995
		JP 7111427 B	29-11-1995
		JP 3504638 T	09-10-1991
		US 5384263 A	24-01-1995
		US 5541070 A	30-07-1996
		US 5679643 A	21-10-1997
		US 5217869 A	08-06-1993
		US 5300425 A	05-04-1994
		US 5763570 A	09-06-1998
US 4752562 A	21-06-1988	US 4517288 A	14-05-1985
		CA 1179940 A	25-12-1984
		DE 3277704 A	23-12-1987
		EP 0070300 A	26-01-1983
		WO 8202601 A	05-08-1982
		US 4786606 A	22-11-1988
		US 4774174 A	27-09-1988
GB 2281122 A	22-02-1995	AU 7389694 A	14-03-1995
		EP 0714514 A	05-06-1996

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Serial Application No.

PCT/US 98/12908

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2281122 A		WO 9505601 A JP 9503291 T	23-02-1995 31-03-1997

## フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW